

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Ertl

**Verbesserung der vaskulären Dysfunktion bei Diabetes mellitus durch den  
HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Rosuvastatin**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Melinda Hemberger

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2008

## **Referentenblatt**

Referent: Prof. Dr. med. J. Bauersachs

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. E. Conzelmann

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:  
24.03.2009

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung.....	1
I. Diabetes mellitus: Epidemiologie, Kosten, Prognose.....	1
II. Pathophysiologie kardiovaskulärer Veränderungen.....	3
1. am Herzen.....	3
2. an Thrombozyten.....	5
3. an Gefäßen: Mikro- und Makroangiopathie, Pathogenese der Atherosklerose.....	6
III. Endotheliale Dysfunktion.....	7
1. Das Endothel: Regulation des Gefäßtonus .....	7
2. Oxidativer Stress.....	8
3. Stickstoffmonoxid (NO).....	10
4. Entkopplung der endothelialen NO-Synthase.....	12
IV. Statine.....	15
1. Pleiotrope Effekte.....	15
2. Rosuvastatin: Chemische Struktur.....	16
3. Studienlage.....	17
V. Zielsetzung .....	18
B. Methoden.....	19
I. Versuchstiere.....	19
II. Induktion des Diabetes.....	19
III. Rosuvastatin-Therapie.....	19
IV. Gefäßpräparation und Thrombozyten-Gewinnung.....	20
V. Luminometer.....	20
VI. Organbad.....	21
VII. Konfokalmikroskopie .....	21
VIII. Durchflusszytometrie.....	22
IX. Statistik.....	23
X. Substanzen.....	23
C. Ergebnisse.....	24
I. Basisdaten und Einschlusskriterien der Versuchsgruppen.....	24
II. Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies in der Gefäßwand.....	24

III. Vasomotorische Funktion.....	27
1. Kontraktion.....	27
2. Relaxation.....	30
IV. eNOS-Expression.....	34
V. Thrombozyten-Aktivierung.....	36
D. Diskussion.....	39
I. Oxidativer Stress.....	39
II. Vasokonstriktion und Vasodilatation .....	40
III. Endotheldysfunktion und reduzierte Reaktivität glatter Gefäßmuskelzellen.....	41
IV. Thrombozytenaktivierung.....	43
V. Primärprävention durch Statine bei Patienten mit Diabetes mellitus.....	45
E. Zusammenfassung.....	48
F. Literatur.....	49

## Verzeichnis verwendeter Abkürzungen:

Abb:	Abbildung
ACE:	Angiotensin-Converting-Enzym
ACS:	Akutes Coronar-Syndrom
BH <sub>2</sub> :	Dihydro-L-Biopterin
BH <sub>4</sub> :	Tetrahydro-L-Biopterin
Ca <sup>2+</sup> :	Kalzium
cGK I:	cGMP-abhängige Kinase I
cGMP:	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CHF:	Congestive Heart Failure
CVD:	Cardiovascular Disease
DEA-NONOate:	2-(N,N-Diethylamino)-diazonolot-2-oxid
EC <sub>50</sub> :	mittlere effektive Konzentration
eNOS:	endotheliale NO-Synthetase
FAD:	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN:	Flavin-Mononukleotid
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE:	Hydroethidin
HMG-CoA:	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoenzymA
IL:	Interleukin
Ko:	Kontrollen
LDL:	Low-Density Lipoprotein
L-NNA:	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin
MACE:	Major-Adverse-Cardiovascular-Event
MI:	Myokardinfarkt
NADPH:	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate
NO:	Nitric Oxide
pAVK:	periphere Arterielle Verschluss-Krankheit
PDGF:	Platelet-derived-Growth-Factor
PGI <sub>2</sub> :	Prostacyclin
PMP:	Platelet-Derived-Microparticles
ROS:	Reactive Oxygen Spezies
RSV:	Rosuvastatin

SEM:	Standard Error of Mean
sGC:	lösliche Guanylatzyklase
SMC:	Smooth Muscle Cells
STZ:	Streptozotozin
TNF- $\alpha$ :	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
VASP:	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein

## **A. Einleitung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit am Tiermodell war die Untersuchung der Wirkung des 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl (HMG)-CoA-Reduktase-Inhibitors Rosuvastatin auf die vaskuläre Funktion bei Diabetes.

### **A. I. Diabetes mellitus**

Definitionsgemäß handelt es sich um einen Diabetes mellitus, wenn der Nüchternblutzuckerwert 126mg/dl übersteigt, bzw. zwei Stunden nach einem oralen Glukosetoleranztest der Blutglukosewert über 200mg/dl liegt. Bevor es zum Vollbild eines manifesten Diabetes mellitus Typ 2 kommt, besteht eine lange Periode der so genannten Insulinresistenz, bei welcher Dyslipidämie, arterielle Hypertension und Glukoseintoleranz entscheidende Störungen des Stoffwechsels darstellen.<sup>1</sup> Während dieser Periode liegen die Blut-Glukosewerte nahezu im normalen Bereich, da die Insulinresistenz durch eine kompensatorische Hyperinsulinämie ausgeglichen werden kann. Erst wenn der Kompensationsmechanismus über die Beta-Zellen des Pankreas versagt, entwickelt sich eine gestörte Glukosetoleranz, charakterisiert durch eine postprandiale Hyperglykämie.<sup>2</sup> Eine postprandiale bzw. chronische Hyperglykämie bei Diabetes hat auf eine Vielzahl von Zellfunktionen einen schädlichen Einfluss, vor allem jedoch auf das Gefäßendothel, die glatten Gefäßmuskelzellen und die Thrombozyten.<sup>3</sup>

Die Daten aus aktuellen Statistiken verdeutlichen, wie wichtig die Etablierung neuer und ergänzender Therapieansätze zur Behandlung der Volkskrankheit Diabetes mellitus ist: So leiden derzeit ca. sieben Millionen Menschen in Deutschland und 17 Millionen Amerikaner an Diabetes. Demnach sind 2006 beinahe 10% aller Deutschen an Diabetes erkrankt (mit steigender Prävalenz im Alter) und es ist anzunehmen, dass die Zahl der Betroffenen in den nächsten Jahren stark zunimmt<sup>4,5</sup>, bis sie sich Schätzungen zufolge in 15 Jahren verdoppelt haben wird.<sup>6</sup> Aufgrund des modernen Lebensstils mit Bewegungsmangel und Überernährung manifestiert sich der Typ 2 Diabetes immer früher, so dass heute auch schon eine große Zahl an Kindern davon betroffen ist. Das Lebenszeitrisko für Diabetes mellitus liegt in der weißen westeuropäischen Bevölkerung bei etwa 30 %.<sup>5</sup> Das bedeutet, dass beinahe jeder Dritte „Diabetesgene“ besitzt und unter entsprechenden Lebensumständen daran erkranken kann.

Aus Daten der Hessischen Versichertenstichprobe wurden die durch Diabetes entstandenen Gesamtkosten ermittelt: demnach wurden 2001 - hochgerechnet auf ganz Deutschland - 14,6

Mrd. Euro allein für die Behandlung des Diabetes mellitus ausgegeben, mit Einbeziehung der indirekten Kosten (Lohnausfall und dergleichen) sogar über 30 Mrd. Euro.<sup>5</sup> Zum Vergleich: Die Kosten des deutschen Verteidigungshaushaltes für das Jahr 2008 sind mit rund 29,45 Mrd. Euro geplant (<http://www.bundestag.de/dasparlament/2007/49/innenpolitik/18535154.html>).

Bei einer Anstiegsrate der Zahl der Diabetiker um derzeit jährlich 5 % und gleichzeitiger überproportionaler Steigerung der Behandlungskosten ist Diabetes ein bedrohlicher Faktor für die zukünftige Finanzierbarkeit des Gesundheitssystems.<sup>5</sup> Für diese hohen Kosten hauptsächlich verantwortlich sind eine Vielzahl von Komplikationen und Langzeitfolgen, die durch einen chronischen Diabetes verursacht werden. Betroffen ist in erster Linie das kardiovaskuläre System.

Eine diabetische Grunderkrankung verschlechtert beispielsweise die Genesung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom und erhöht sowohl das Risiko für einen Myokardinfarkt während des Krankenhausaufenthaltes, wie auch die Komplikations- (z.B. Re-Thrombosierung nach perkutaner Koronarintervention<sup>7-9</sup>) und Sterblichkeitsrate nach Myokardinfarkt.<sup>10</sup> Neben den Koronargefäßen sind die extrakraniellen hirnversorgenden Gefäße von schädigenden Einflüssen durch Diabetes besonders betroffen und weisen dementsprechend hohe Atherosklerose-Raten auf.<sup>3</sup> Jeder dritte Patient mit Schlaganfall ist Diabetiker<sup>11</sup>, und das Risiko, nach einem Insult an dessen direkten Folgen zu versterben oder eine Demenz zu entwickeln, ist signifikant erhöht im Vergleich zu Schlaganfallpatienten ohne Diabetes.<sup>12</sup> Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) ist unter Diabetikern drei bis vier mal häufiger vertreten als in einer gesunden Vergleichsgruppe<sup>13;14</sup> und tritt auch verstärkt symptomatisch in Erscheinung. Die Rate an nichttraumatischen Amputationen ist bei Diabetikern (25 Jahre nach der Erstdiagnose) im Vergleich zur nicht-diabetischen Gesamtbevölkerung deutlich erhöht: für eine Amputation direkt unterhalb des Kniegelenks ergab sich ein beinahe 12-fach höheres Risiko als bei Nicht-Diabetikern, im Bereich des Vorfußes sogar ein 400-fach erhöhtes Risiko.<sup>15</sup> Ca. 50% aller Amputationen im Bereich der unteren Extremität werden an Patienten mit Diabetes durchgeführt, ein Resultat der diabetischen Angiopathie, aber auch der diabetischen Neuropathie.<sup>16;17</sup> Wundheilungsstörungen bei Diabetikern verlängern die Liegedauer im Krankenhaus nach operativen Eingriffen und erhöhen die Komplikationsrate durch Wundinfektionen.

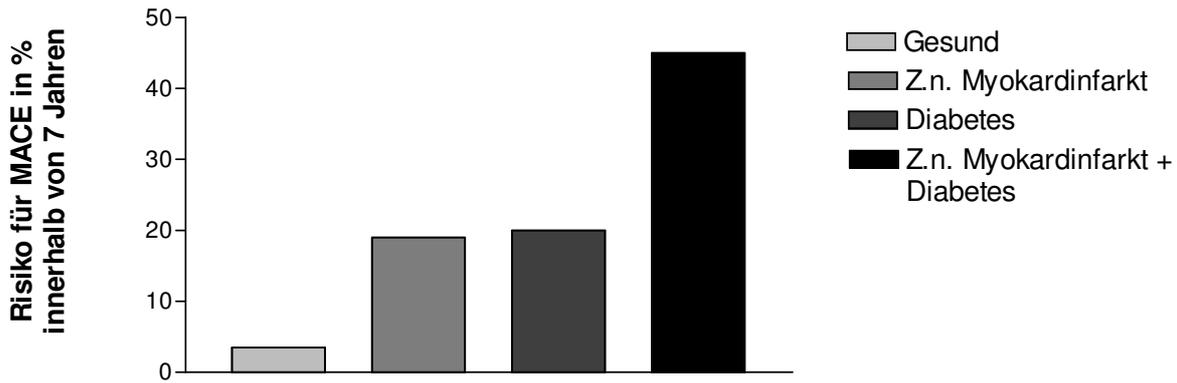
Anzumerken, dass selbst der protektive Schutz der weiblichen Geschlechtshormone durch den schädigenden Einfluss des diabetischen Stoffwechsellmilieus nicht nur neutralisiert wird, sondern Diabetikerinnen sogar höhere Inzidenzraten für kardiovaskuläre Ereignisse aufweisen als ihre männlichen Leidensgenossen.<sup>18</sup>

Eine Optimierung sowohl der präventiven Maßnahmen, als auch der Therapie von Diabetes zur Vermeidung und Eindämmung der Komplikationen ist aus medizinischer, wie auch aus wirtschaftlicher Sicht unbedingt erstrebenswert.

## **A. II. Pathophysiologie kardiovaskulärer Veränderungen**

### A. II. 1. Herz

Der direkte Zusammenhang zwischen Diabetes und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (cardiovascular disease, CVD) führte zu der Erkenntnis der "common soil"-Hypothese.<sup>19</sup> Diese besagt, dass Diabetes und CVD die selben genetischen und exogenen Ursachen besitzen wie beispielsweise die Insulinresistenz.<sup>1</sup> Auch die Forschungsergebnisse von Haffner et al.<sup>1</sup> beschreiben die enge Verbindung zwischen Diabetes Typ 2 und CVD: Abb.1 zeigt über eine Zeitspanne von sieben Jahren die Inzidenz eines kardiovaskulären Ereignisses (major adverse cardiovascular event, MACE; hierzu zählen Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses) im Zusammenhang mit einem vorangegangenen Myokardinfarkt oder bei diabetischer Grunderkrankung.



**Abb.1:** Nach Haffner<sup>20</sup> wird die Inzidenzrate für ein kardiovaskuläres Ereignis (MACE) innerhalb von sieben Jahren dargestellt: Ohne vorangegangenen Myokardinfarkt und ohne diabetische Grunderkrankung (Gesund) betrug die Inzidenz eines MACE 3.5%. Die Inzidenz unter Nichtdiabetikern mit bereits stattgefundenem Myokardinfarkt (Z.n. Myokardinfarkt) betrug 18.8%. Bei diabetischer Grunderkrankung ohne vorangegangenen Myokardinfarkt (Diabetes) lag die Inzidenz bei 20.2%. Bei diabetischer Grunderkrankung sowie vorangegangenem Myokardinfarkt (Z.n. Myokardinfarkt + Diabetes) betrug die Inzidenz für das Auftreten eines weiteren MACE 45%.

Diese Daten belegen, dass sowohl ein vorausgegangener Myokardinfarkt, wie auch Diabetes die Inzidenz für weitere MACE in etwa derselben Größenordnung erhöhen (ca. um den Faktor 5-6). Des Weiteren wird ersichtlich, dass beim Zusammentreffen dieser beiden Risikofaktoren (Diabetes und Z.n. Myokardinfarkt) sich die einzelnen Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten weiterer MACE addieren.

Im Folgenden wird erläutert, in welcher Weise Diabetes die Herzfunktion beeinflusst.

Diabetes ist aus drei Gründen ein Risikofaktor für die Entstehung von Herzversagen:

1. Die koronare Atherosklerose und deren Komplikationen, wie beispielsweise der Myokardinfarkt, werden durch Diabetes verursacht oder beschleunigt.<sup>21</sup>
2. Diabetes ist häufig assoziiert mit einer arteriellen Hypertonie.<sup>21;22</sup>
3. Das Herz, bzw. der Herzmuskel, ist ein Insulin-sensibles Organ.<sup>23</sup> Die diabetische Kardiomyopathie erhöht das Risiko einer Herzinsuffizienz unabhängig von Koronarsklerose und Hypertonus<sup>24</sup>,

wobei der letzte Punkt auf folgende Mechanismen infolge erhöhter Blutglukosewerte zurückgeführt werden kann:

- eine nicht-enzymatische Glykosylierung von Proteinen
- ein Anstieg des oxidativen Stresses
- eine Veränderung von Isoformen der Proteinkinase C<sup>25-28</sup>.

(Auch andere mögliche pathophysiologische Verbindungen zwischen Diabetes und Herzinsuffizienz wurden beschrieben, wie etwa die Aktivierung des sympathischen

Nervensystems, die diastolische Dysfunktion, erhöhte Werte zirkulierender Zytokine, z.B. TNF-  $\alpha$ , u.a.<sup>29-31</sup>).

### A. II. 2. Thrombozyten

Es wurde beobachtet, dass bei Erkrankungen wie beispielsweise dem akuten Koronarsyndrom, der dilatativen Herzinsuffizienz, der Hypercholesterinämie und Diabetes, die alle mit einer chronischen Endotheldysfunktion einhergehen, die Thrombozyten-Aktivität erhöht ist, was sich klinisch in gehäuften atherothrombotischen Ereignissen manifestiert. Die pathogenetische Grundlage hierfür ist eine reduzierte Bioverfügbarkeit des bedeutsamen endogenen Vasodilatators Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO), wie man sie bei einer diabetischen Stoffwechsellage vorfindet.<sup>31; 32</sup>

Schäfer et al. konnten zeigen, dass eine Inhibition der systemischen NO-Bildung beim gesunden Menschen eine sofortige Thrombozyten-Aktivierung induziert, welche durch exogene NO-Applikation verhindert werden konnte.<sup>33</sup> Eine gesteigerte Thrombozyten-Reaktivität wurde als ein möglicher Mechanismus der beschleunigten Atherosklerose-Entwicklung vermutet<sup>32</sup>, wie es bei Patienten mit Diabetes in Form von Mikroembolisationen und arteriellen Embolien zu beobachten ist. Die Aktivierung von Thrombozyten bewirkt eine Formveränderung und Degranulation der Thrombozyten mit rascher Expression von Adhäsionsmolekülen, vor allem P-Selektin und CD40-Ligand an der Thrombozytenoberfläche. P-Selektin ist maßgeblich an der Thrombozyten-Adhäsion an Leukozyten beteiligt.<sup>34</sup> CD40-Ligand ist für die Bildung arterieller Thromben und die Endothel-Aktivierung von Bedeutung, welche bei Diabetes gehäuft auftreten.<sup>35</sup>

Die Beobachtung, dass Thrombozyten vermehrt an intaktes, aber dysfunktionales Endothel anheften, und dass die Oberflächenexpression der potentiellen Adhäsionsmoleküle unter diesen Bedingungen verstärkt ist, unterstützt die Hypothese, dass das vom Endothel physiologisch freigesetzte NO die Thrombozyten-Aktivierung in vivo inhibiert. Man identifizierte NO als einen Inhibitor der Thrombozyten-Aktivierung, -Adhäsion und -Aggregation.<sup>36</sup> Ein Mangel an NO, wie er bei Diabetes im Rahmen einer Endotheldysfunktion vorliegt, führt also indirekt zu einer Aktivierung der Thrombozyten.<sup>32</sup>

### A. II. 3. Gefäße

Bei den Auswirkungen eines Diabetes auf die Gefäße wird zwischen einer so genannten Mikro- und Makroangiopathie unterschieden.

#### **Mikroangiopathie**

Die schädlichen Auswirkungen eines Diabetes sind im Bereich der Arteriolen und Kapillaren äußerst vielfältig. Betroffen sind vor allem das Auge (Retinopathie), die Niere (Nephropathie), die Nerven (Neuropathie) und die Endstromgebiete (Wundheilungsstörungen, diabetischer Fuß, erektile Dysfunktion).

Charakteristisch für alle betroffenen Systeme sind ein erhöhter mikrovaskulärer Druck und Blutfluß, mit daraus resultierender Schädigung des Endothels. Das betroffene Gefäß reagiert mit einer mikrovaskulären Sklerose, was einen Verlust an vasodilatatorischer Adaptationsfähigkeit und ein eingeschränktes Autoregulationsvermögen zur Folge hat. Dies führt wiederum zu einer Blutdruck- und damit auch Blutflusserhöhung im Gefäß.<sup>37</sup> Man kann also von einem Circulus vitiosus mikroangiopathischer Prozesse bei Diabetes sprechen.

#### **Makroangiopathie**

Die Makroangiopathie, gekennzeichnet durch arteriosklerotische Veränderungen der großen Gefäße, manifestiert sich hauptsächlich an den Koronararterien, den Gefäßen der unteren Extremität und den Karotiden.<sup>3</sup> In den Industrieländern sind kardiovaskuläre Erkrankungen die am häufigsten zum Tode führenden Krankheiten, überwiegend in Form von Myokardinfarkt und zerebralen Insulten, und in den meisten Fällen verursacht durch Atherosklerose.

#### **Pathogenese der Atherosklerose**

Rudolph Virchow (1821–1902), der von 1849 bis 1855 den Lehrstuhl für pathologische Anatomie an der Universität in Würzburg innehatte, erkannte bereits, dass im Wesentlichen drei Pathomechanismen der Entstehung von Thrombosen in venösen Gefäßen zugrunde liegen:

1. Irritationen oder Läsionen der Gefäßinnenwände.
2. Eine erhöhte Koagulationsneigung des Blutes.
3. Eine Störung der Strömungsverhältnisse des Blutflusses.

Diese dem venösen System zugrunde liegenden Pathomechanismen werden nach ihrem Beschreiber als Virchow'sche Trias bezeichnet und lassen sich im Allgemeinen auch auf die Entstehung atherothrombotischer Herde arterieller Gefäße übertragen.<sup>4</sup>

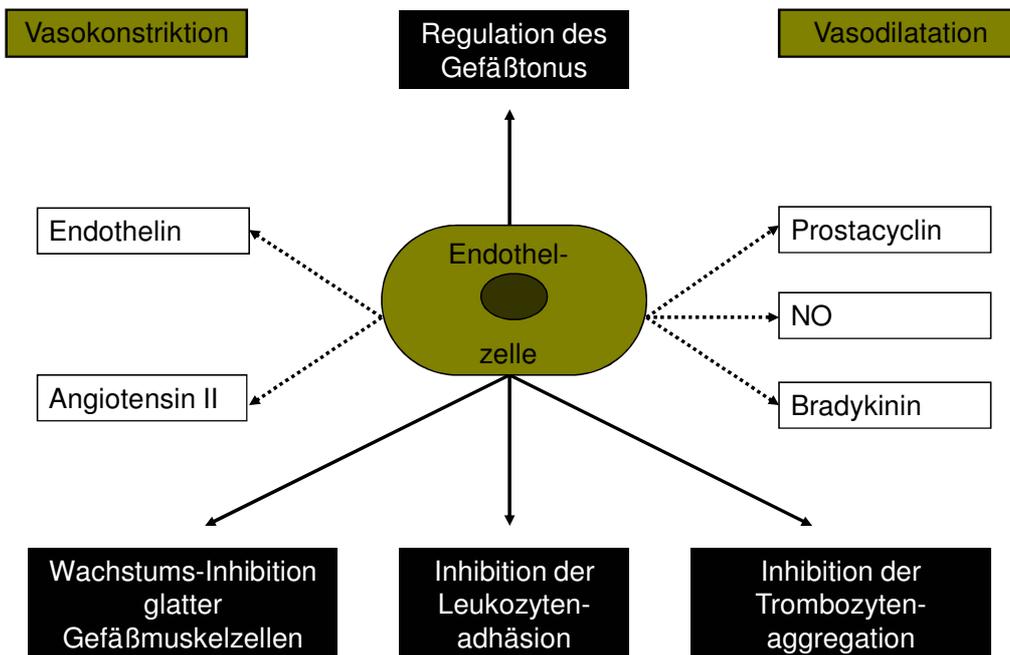
Diabetes begünstigt als sogenannter Risikofaktor erster Ordnung in hohem Maße die Progression der Atherosklerose. Erstes Anzeichen einer atherosklerotischen Wandveränderung ist die Ansammlung von Schaumzellen (eingewanderte Makrophagen mit eingelagerten Lipidvakuolen) in der Intima. Im weiteren pathogenetischen Verlauf der Atheroskleroseentstehung kommt es aufgrund einer Stimulation über vermehrt freigesetzte Wachstumsfaktoren zu einer Proliferation glatter Muskelzellen in der Arterienintima, wobei fibröse Plaques und Verdickungen der Gefäßwand entstehen. Diese Muskelzellen transformieren zu Kollagen-synthetisierenden Zellen und fibrosieren die sie umgebenden Plaques. Durch ein ständiges Wachstum der Plaques wird das Gefäßlumen zunehmend eingeeengt. Des Weiteren induziert die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur eine teilweise Ablösung des Endothels an der betroffenen Stelle.<sup>4</sup> Die Kontraktion der Gefäßwand wird dadurch ungerichtet und neigt zu vasomotorischen Spasmen.

In die hyalinisierten Plaques werden vermehrt Kalksalze eingelagert, die zunächst gedeckten Plaques werden brüchig und drohen durch Dehnung des Gefäßes oder die durch den Blutfluss erzeugte Schubspannung an der luminalen Gefäßseite zu rupturieren. Rupturierte Plaques dienen wiederum als besonders prädestinierte Anheftungsstellen für Thrombozytengerinnsel und bergen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten akuter kardiovaskulärer Ereignisse. Eine Thrombozytenanheftung an die Plaques hat eine erhöhte lokale Zytokin-Freisetzung zur Folge, es kommt zum Circulus vitiosus der atherogenen Prozesse.

### **A. III. Endotheliale Dysfunktion**

#### A. III.1. Das Endothel: Regulation des Gefäßtonus

Das Endothel ist das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers. Es produziert sowohl Vasodilatoren wie NO, Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Bradykinin, als auch die Vasokonstriktoren Endothelin und Angiotensin II.<sup>38</sup> Kommt es zur Dysfunktion dieses empfindlichen Systems, so geraten Vasokonstriktion und –dilatation aus dem Gleichgewicht.



**Abb.2:** Funktionen der Endothelzelle: Barriere gegen Atherosklerose, sowie Regulation des Gefäßtonus über die Produktion von Vasokonstriktoren und –dilatoren.<sup>4</sup>

Im Rahmen einer Endotheldysfunktion lassen sich mehrere pathophysiologische Prozesse an der Gefäßwand beobachten: das Endothel-abhängige Vasorelaxations-Vermögen ist herabgesetzt, während gleichzeitig der Adhäsionsgrad sowohl zwischen Endothel und Thrombozyten, als auch Endothel und Leukozyten ansteigt und die Gefäßpermeabilität zunimmt. Zusätzlich kommt es zu einer veränderten Produktion verschiedener vasoaktiver Substanzen, welche das Koagulationsgleichgewicht, die Homöostase der extrazellulären Matrix und die Physiologie der glatten Gefäßmuskulatur beeinflussen.

### A. III. 2. Oxidativer Stress

Insulin-Resistenz, eine gestörte Glucose-Toleranz und Diabetes sind assoziiert mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und gleichzeitig begleitet von erhöhtem oxidativem Stress im Organismus. Schon mehrmals wurde nachgewiesen, dass Diabetes zum einen mit einer erhöhten Produktion freier Radikale verbunden ist<sup>3;44-47</sup> und zum anderen mit einer Beeinträchtigung der antioxidativen Abwehr einhergeht.<sup>48-50</sup> Hohe Werte freier Radikale verursachen Schäden an Zellproteinen, Membranlipiden und Nukleinsäuren und führen schließlich zum Zelltod, vermutlich über Mechanismen wie Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren und der Proteinkinase C, sowie „Advanced glycation end products“ (AGEs).<sup>51</sup>

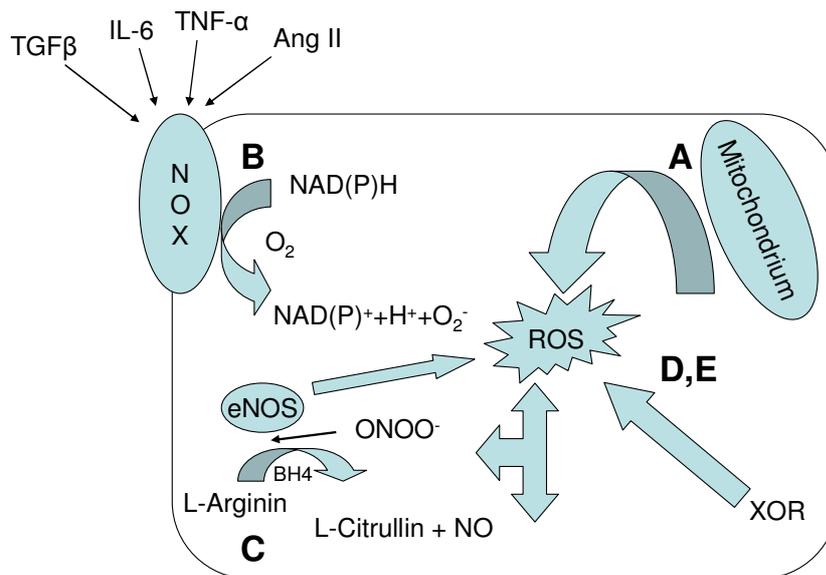
Chronisch erhöhte Blutglukosewerte führen zu einer Veränderung der Isoformen, bzw. zu einer Aktivierung der Proteinkinase C. Dies fördert zum einen die Produktion von extrazellulärer Matrix und hat zum anderen eine gesteigerte Aktivität des „Angiotensin Converting Enzyms“ (ACE) zur Folge, welches wiederum die Angiotensin II-Bildung und den ACE-Substrat-Abbau (z.B. Bradykinin) beschleunigt.<sup>38</sup> Angiotensin II aktiviert die NADPH-Oxidase, wodurch die Superoxidproduktion sowie der Bradykinin-Abbau<sup>28</sup> gesteigert und die Bioverfügbarkeit von NO vermindert werden.<sup>39</sup> Des Weiteren bewirkt eine chronische Hyperglykämie eine verstärkte Glykosylierung von Proteinen zu so genannten AGEs, welche dadurch ihre ursprüngliche Funktion verlieren.<sup>40</sup> In der Gesamtheit resultiert hieraus eine erhöhte Kontraktilität und beeinträchtigte Permeabilität der Gefäße aufgrund einer Basalmembranverdickung der Kapillaren, sowie einer Hyalinisierung der Arteriolenwand mit konsekutiver Diffusions- und Mikrozirkulationsstörung.<sup>41</sup> Ursächlich hierfür ist zum einen die Anhäufung von Sorbit in bestimmten Zelltypen und eine daraus resultierende verstärkte osmotische Wassereinlagerung in diesen Zellen. Die Folgen all dieser Prozesse sind Gefäßschäden besonders der Netzhaut, der Nerven, der Niere und des Herzens.<sup>42</sup>

Auch während des natürlichen Zellstoffwechsels entstehen reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), also Moleküle oder Atome, die durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen charakterisiert sind, wie z.B. Superoxid ( $O_2^-$ ), Hydroxyl ( $OH^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ). Generiert werden diese natürlichen ROS bei:<sup>53</sup>

- A. der Zellatmung in den Mitochondrien
- B. dem NADPH-Oxidase-Stoffwechselweg:  
$$NAD(P)H + 2O_2 \rightarrow NAD(P)^+ + H^+ + 2O_2^{\bullet -}$$
- C. dem entkoppelten NO-Synthase-Stoffwechsel
- D. dem Purin-Metabolismus
- E. dem Xanthin-Oxidase-Stoffwechselweg

Die Mehrheit dieser natürlichen ROS wird über angeborene antioxidative Puffersysteme abgefangen, wodurch ein stabiles intrazelluläres Milieu aufrechterhalten werden kann.<sup>53</sup>

Kommt es jedoch in einem der oben genannten Systeme zu einer Dysregulation oder Entgleisung, sind die natürlichen Abpufferungsmechanismen überlastet. Es resultiert eine Anreicherung von ROS in der Zelle.



**Abb.3:** Die überschießende Erzeugung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) in vaskulären Endothelzellen durch Entgleisung der verschiedenen Stoffwechselwege: (A) Entkopplung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung; (B) Aktivierung des NAD(P)H-Oxidase-Systems (NOX) durch Entzündungsmediatoren wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , Wachstumsfaktoren wie TGF $\beta$  (transforming growth factor-beta) und Angiotensin II; (C) Entkopplung der NO-Synthese und eine NO-Anreicherung durch positive Rückkopplung über Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) – Bildung; (D), (E) Das Xanthin- Oxidoreduktase (XOR) System;

Aus Mehta et al. Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2006; 38: 794-803.<sup>53</sup>

Ebenso kann ein Ungleichgewicht dieses Systems durch eine Abnahme der ROS-Abpufferungsfaktoren erzeugt werden, wie es bei einer Endotheldysfunktion der Fall ist. Von größter Bedeutung als antioxidative Substanz im Organismus ist dabei das NO-Molekül.

### A. III. 3. Stickstoffmonoxid (NO)

1988 wiesen Moncada und Palmer erstmals nach, dass der früher sogenannte EDRF (endothelial-derived relaxing factor) NO ist. Die endotheliale NO-Synthese (eNOS) ist die vorherrschende NOS-Isoform in den Gefäßen und der Hauptproduzent von NO im Endothel. NO wird aus L-Arginin synthetisiert, seine Freisetzung über die eNOS erfolgt über eine Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (CaM)-Aktivierung. Die NO-Produktion des Endothels wird durch eine Vielfalt von Rezeptor-Agonisten stimuliert, aber auch mittels Schubspannung, die durch den Blutfluss an der luminalen Gefäßwand erzeugt wird. Die NO- Freisetzung via Schubspannung ist im Gegensatz zu der Rezeptor-vermittelten NO-Freisetzung Kalzium-unabhängig.<sup>54</sup> Wie

sich herausstellte, ist die endotheliale NO-Produktion sowohl in Bereichen atherosklerotischer Läsionen, aber auch im Zustand der Insulin-Resistenz vermindert und daher als ein entscheidender und verbindender Faktor der Pathomechanismen von Diabetes und Atherosklerose anzusehen.<sup>4</sup> NO dilatiert die Gefäße durch Stimulation der NO-sensitiven löslichen Guanylatzyklase (sGC) und einer damit verbundenen Anreicherung von zyklischem 3,5-Guanosinmonophosphat (cGMP) in den glatten Muskelzellen. Darüber hinaus besitzt NO einen antiproliferativen Effekt auf die glatten Gefäßmuskelzellen (smooth muscle cells, SMC), welcher vermutlich ebenso über cGMP vermittelt wird und zu einer Inhibition der DNA-Synthese, der Mitogenese und der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen führt.<sup>54</sup> NO wird darüber hinaus in das Gefäßlumen freigesetzt. Dort wirkt es Thrombozyten-inhibierend, indem die oben erwähnte cGMP- Anreicherung zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Kinase I (cGK I) in den glatten Gefäßmuskelzellen führt. Diese induziert ihrerseits die Phosphorylierung von VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), einem Substrat der cGMP- und cAMP-abhängigen Proteinkinase, welches die Thrombozytenaktivierung hemmt.<sup>54-56</sup>

Des Weiteren inhibiert NO auch die Leukozyten-Adhäsion an der Gefäßwand, indem es zum einen mit dem Adhäsions-Molekül CD11/CD18 auf der Leukozyten-Oberfläche interferiert, so dass dieses keine Bindung mehr mit dem Endothel eingehen kann; zum anderen unterdrückt NO die CD11/CD18 Expression auf Leukozyten. Da die Anheftung von Leukozyten einen frühen pathogenetischen Schritt in der Atherosklerose-Entwicklung darstellt, ist NO als Inhibitor der Leukozyten-Adhäsion ein Schutzfaktor gegen die erste morphologische Manifestation der Atherosklerose. Außerdem wird die Gefäßmuskelzelle über eine Verhinderung der Thrombozytenaggregation vor PDGF (platelet-derived-growth-factor)-Einflüssen abgeschirmt. Daher verhindert NO auch einen späteren Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose, nämlich die Bildung fibröser Plaques. Die Summe dieser vasoprotektiven Effekte erklärt, dass endothelial produziertes NO einer der bedeutendsten Schutzfaktoren gegen Atherosklerose ist.<sup>54</sup>

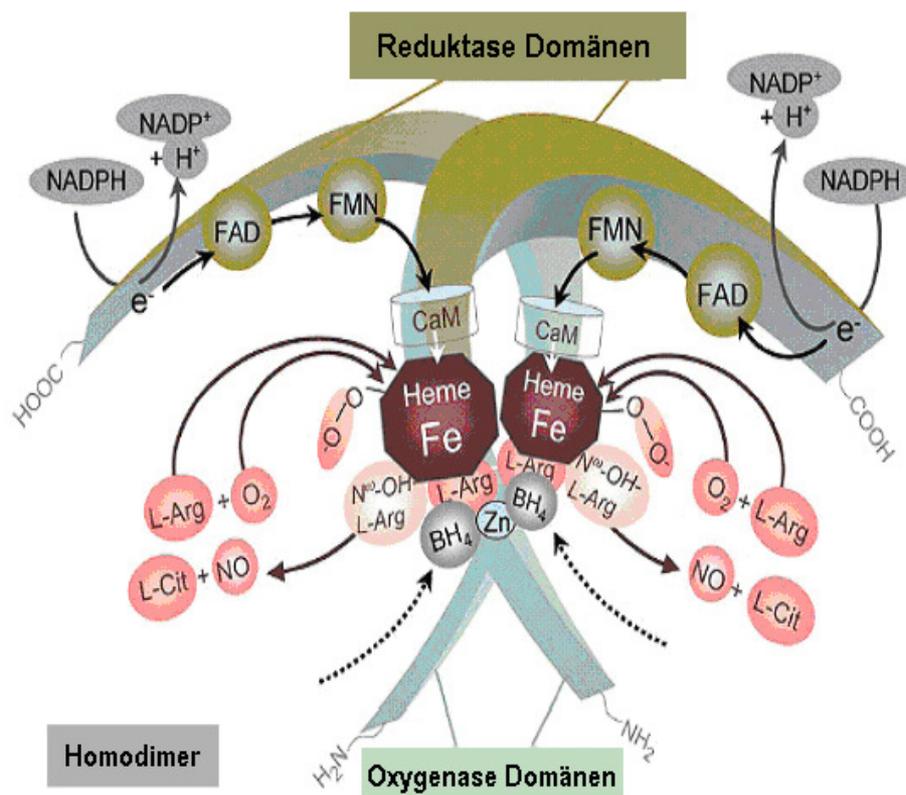
NO ist überdies ein direkter Vasodilatator und wirkt daher unabhängig von der Endothel-Integrität. Im Gegensatz dazu induzieren indirekte Vasodilatoren, wie zum Beispiel Acetylcholin, eine paradoxe Vasokonstriktion in Gefäßabschnitten mit Endothel-Läsionen.<sup>38</sup>

#### A. III. 4. Entkopplung der endothelialen NO-Synthase

Die eNOS ist der Hauptproduzent von NO in den Gefäßen. Im normalen Funktionszustand transferiert eNOS Elektronen von NADPH mittels Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN) in der Reduktase-Einheit des Enzyms zum Eisen der Oxygenase-Einheit. Dort wird das Substrat L-Arginin zu L-Citrullin und NO oxidiert.

Dieser physiologische Fluss der Elektronen erfordert folgende Voraussetzungen:

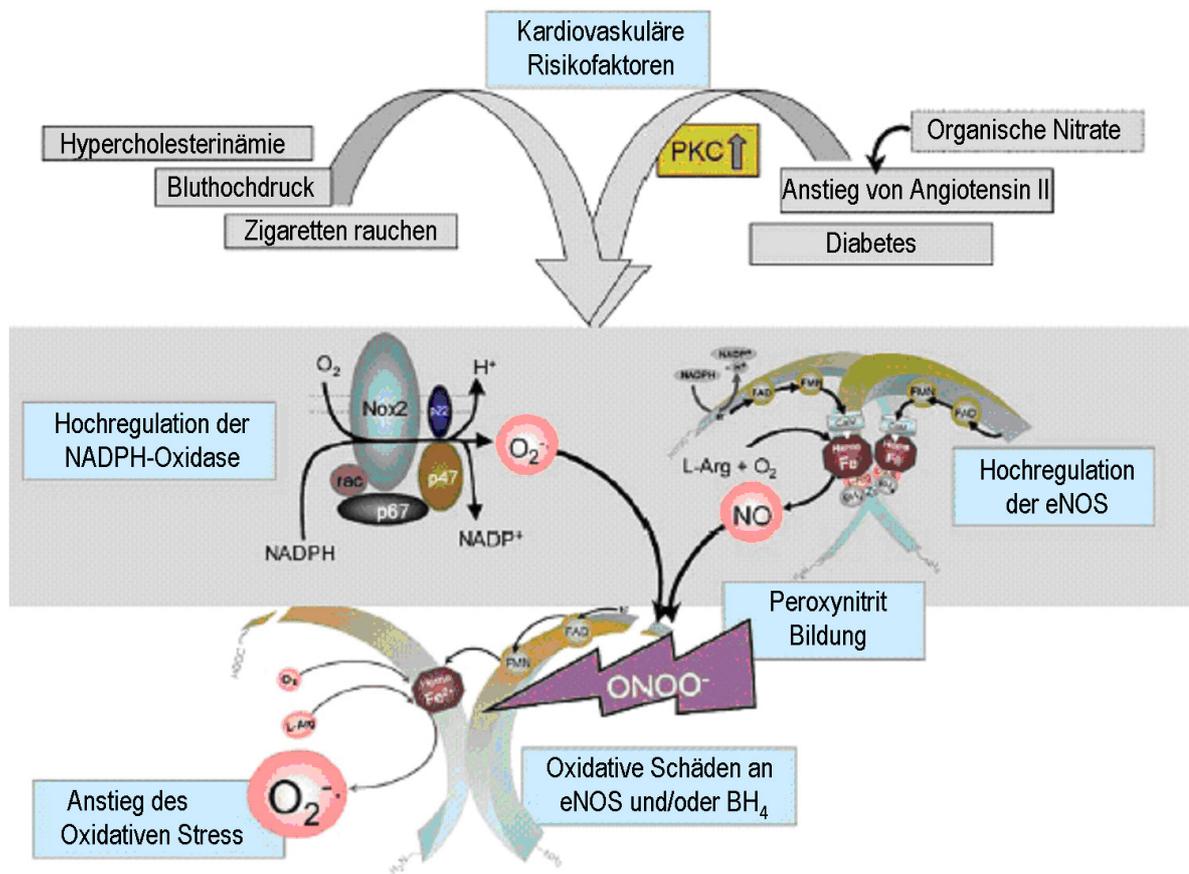
1. das Enzym muss in seiner Form als Dimer vorliegen
2. die Anwesenheit des Substrates (L-Arginin)
3. die Anwesenheit des Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), welches ein starkes natürliches Reduktionspotenzial aufweist
4. die Anwesenheit molekularen Sauerstoffs als Ko-Substrat



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der eNOS-Struktur und der von eNOS katalysierten Reaktion. Alle NOS-Enzyme sind Homodimere, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten besitzt eine Reduktase- und eine Oxygenase-Domäne. Kofaktoren der Reduktase-Einheit sind Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN). Sie übernehmen Elektronen von NADPH und übertragen diese auf das Eisen (Fe) der Oxygenase-Domäne. Unter Anwesenheit des Substrates L-Arginin und des Kofaktors BH<sub>4</sub> als Reduktions-Agens erzeugt ein intaktes NOS-Dimer mittels einer Fe- und O<sub>2</sub>-Reduktion über die Zwischenstufe der N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-Arginin (N<sup>ω</sup>-OH-L-Arg)-Oxidation schließlich NO und L-Citrullin.<sup>4</sup>

Unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen, wie beispielsweise bei Diabetes (aber auch arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie und chronischem Nikotinabusus) steigt die ROS-Produktion in den Gefäßwänden an. Man identifizierte die NADPH-Oxidase als einen Hauptproduzenten von ROS und stellte fest, dass dieses Enzym unter diabetischen Stoffwechselbedingungen verstärkt exprimiert wird.<sup>57-59</sup> Ebenso ist bei Diabetes die eNOS-Expression gesteigert, um die vermehrt anfallenden Superoxide mit einer Erhöhung der NO-Konzentration abzufangen. Man entdeckte jedoch, dass es trotz eines Anstieges der eNOS-Expression zu einer reduzierten Endothel-abhängigen Relaxation, bzw. Dilatation der Gefäße kommt<sup>57-59</sup>, was folgendermaßen zu erklären ist:

Das Superoxidanion reagiert stark mit NO unter Entstehung von großen Mengen Peroxynitrit (ONOO-), einer sehr instabilen und reaktionsfreudigen Substanz, und somit einem potenten Oxidationsmittel. BH<sub>4</sub> ist äußerst Oxidations-anfällig, so auch verstärkt in der Anwesenheit von Peroxynitrit. Die Oxidation von BH<sub>4</sub> zum inaktiven BH<sub>2</sub>, sowie eine Schädigung des Zink-Thiols an der Verbindungsstelle der eNOS-Dimere durch Oxidation führen zu einer Entkopplung der eNOS.<sup>4;54</sup> Im entkoppelten Zustand produziert die Oxygenase-Domäne der eNOS unabhängig von NO-Feedbackmechanismen selbst Superoxid, wie es in einigen in vitro Studien und im Tiermodell bewiesen werden konnte.<sup>54</sup>



**Abb.5:** Kardiovaskuläre Erkrankungen erzeugen oxidativen Stress und endotheliale Dysfunktion. Durch eine Schädigung des kardiovaskulären Systems kommt es zu einer erhöhten Expression sowohl der NADPH-Oxidase in der Gefäßwand, als auch der eNOS. Ihre jeweiligen Endprodukte reagieren zusammen zu Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>). Dieses oxidiert den eNOS-Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und/oder beschädigt den Zink-Thiol-Anteil der eNOS durch Oxidation. Als Folge daraus produziert eNOS unabhängig von der NO-Konzentration Sauerstoffradikale durch eine chemische Reduktion; die funktionale eNOS entkoppelt zu einem Superoxid-produzierendem Enzym, welches zur Bildung von oxidativem Stress in den Gefäßen maßgeblich beiträgt. PKC= Proteinkinase C.<sup>54</sup>

## A. IV. Statine

Erstmals eingeführt in der Behandlung der CVD wurden die Statine im Jahr 1987. Sie inhibieren die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) -Reduktase überwiegend in der Leber (aber auch in Muskelzellen) und hemmen somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der endogenen Cholesterinsynthese, die Deacylierung von HMG-CoA zu Mevalonsäure durch die HMG-CoA-Reduktase.<sup>60</sup>

Alle Statine besitzen denselben Wirkmechanismus, nämlich die kompetitive Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Blockade der Bindungsstelle für HMG-CoA.<sup>61</sup> Die Hemmung der Cholesterinsynthese in der Leber führt wiederum zu einer Hochregulation der hepatischen Low-Density-Lipoprotein (LDL) -Rezeptoren und dadurch zu einer vermehrten Aufnahme von LDL-Cholesterin aus dem Blut in die Hepatozyten<sup>62</sup>, woraus eine Reduktion der atherogenen Lipoproteine im Blut resultiert. Weiterhin gemeinsam ist den Statinen die HMG-ähnliche Seitenkette als Pharmakophor, an welchem jedoch jeweils verschiedene chemische Gruppen angeheftet sind. Dadurch variieren die Bindungsaffinität zur HMG-CoA-Reduktase<sup>54;63</sup>, die Affinität zu hepatischem und nicht-hepatischem Gewebe<sup>64</sup>, die Bioverfügbarkeit im systemischen Blutkreislauf für die Aufnahme in nicht-hepatische Gewebe, sowie die Verstoffwechslung und Elimination<sup>65</sup> der unterschiedlichen Statine.

### A. IV. 1. Pleiotrope Effekte

Zusätzlich zu der Lipidsenkung besitzen Statine Cholesterin-unabhängige positive Auswirkungen auf das Gefäßsystem, so genannte „pleiotrope Effekte“. Hierzu zählen insbesondere die Verbesserung der NO-abhängigen Endothelfunktion, antioxidative und antiinflammatorische<sup>54</sup> Effekte sowie eine gesteigerte Bildung von gefäßprotektiven Progenitorzellen<sup>60</sup>. Mechanistisch können diese Beobachtungen u. a. dadurch erklärt werden, dass die Hemmung der Mevalonatsynthese durch Statine nicht nur die Cholesterinsynthese, sondern auch die Formation der Intermediärprodukte des Syntheseweges, die Isoprenoide, vermindert.<sup>60</sup>

In vitro-Studien von Laufs et al.<sup>66</sup> konnten zeigen, dass Statine die eNOS-Aktivität in kultivierten menschlichen Endothelzellen<sup>67</sup> (aber auch Myozyten und interstitiellen Fibroblasten im Herz<sup>68</sup>) anregen. Dadurch wird die endotheliale NO-Produktion durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren gefördert<sup>68</sup>, die NO-Bioverfügbarkeit gesteigert und ROS reduziert. In zahlreichen Studien wurden die möglichen Mechanismen, die zu einer Steigerung der eNOS-Aktivität durch Statine führen, untersucht. Die zwei geläufigsten Erklärungen sind zum einen die Verlängerung der eNOS-mRNA-Halbwertszeit mit einer

Erhöhung der eNOS-Proteine<sup>68</sup>, zum anderen die Aktivierung der Proteinkinase Akt.<sup>67</sup> Infolge der Proteinkinase-Aktivierung wird eNOS phosphoryliert und produziert vermehrt NO. Im Gegensatz zur Regulierung auf mRNA-Ebene, deren Auswirkungen in einer Zeitspanne von Stunden bis Tagen zu beobachten sind, erfolgt die Proteinkinase-Aktivierung innerhalb weniger Minuten und führt umgehend zu einer Aktivitätssteigerung der eNOS.<sup>67</sup>

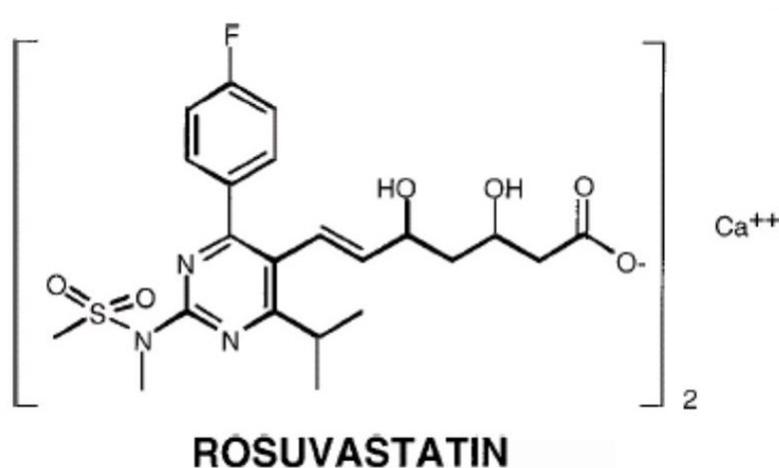
Durch die Stabilisierung von Atherosklerose-Herden und die Verbesserung der endothelialen Gefäßfunktion wirkten sich Statine daher besonders förderlich auf das vaskuläre System aus. Die beobachteten pleiotropen Effekte unterstützen die Empfehlung, Statine als Lipidsenker beim Vorliegen eines globalen vaskulären Risikos als Mittel der ersten Wahl einzusetzen.<sup>60</sup>

#### A. IV. 2. Rosuvastatin

Verglichen mit anderen Statinen erwies sich Rosuvastatin (RSV) als ein potenter synthetischer HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor mit einem hohen Grad an hepatozytärer Selektivität. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Statinen ist seine geringe Metabolisierung im hepatischen Cytochrom P-450-System; dadurch erhält Rosuvastatin eine längere Halbwertszeit mit dementsprechend langer systemischer Bioverfügbarkeit im Organismus, sowie eine reduzierte Interaktion mit Stoffwechsel- und Ausscheidungswegen anderer Pharmaka.<sup>69</sup>

#### **Chemische Struktur**

Rosuvastatin (Fluorophenyl-Isopropyl-Methyl[Methylsulphonyl]-Aminopyridinydinyl-Hydroxyheptansäure) ist, verglichen mit anderen Statinen, stark hydrophil (ähnlich Pravastatin), was durch seine polare Methan-Sulfonamid-Gruppe bedingt ist. Das Pharmakophor wird durch ein Dihydroxysäure-Hapten (3R, 5S-Enantiomer) gebildet.



**Abb.6:** Die chemische Struktur von Rosuvastatin (Laborname ZD 4522).<sup>70</sup>

Die hydrophile Struktur von Rosuvastatin ist ausschlaggebend für die günstigere Verstoffwechslung im Organismus. Sie beschränkt die passive Diffusion durch die Zelle in Abwesenheit eines selektiven Transporters und ist auch für die geringe Metabolisierung via Cytochrom P-450-Pathway verantwortlich.<sup>70</sup> Die Polarität des Rosuvastatin-Moleküls ermöglicht nicht nur die Bindung an die HMG-CoA-Reduktase über van der Waals Kräfte (wie sie allen Statinen zuteil ist), sondern zusätzlich über eine elektronegative Sulfon-Gruppe. Unter allen Statinen erhält Rosuvastatin dadurch die größte Anzahl an Interaktionsstellen mit der HMG-CoA-Reduktase.<sup>61;71</sup> Dies ist wohl einer der Gründe für die deutlichen Ergebnisse, die unter der Behandlung mit Rosuvastatin erzielt wurden, wie beispielsweise eine Reduktion des LDL-Cholesterol (LDL-C)-Spiegels um 65%, was zuvor von keinem der anderen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren erreicht wurde.<sup>70</sup>

Im Tiermodell (Ratte) war eine Stunde nach Verabreichung einer oralen Dosis Rosuvastatin von 12mg/kg Körpergewicht die hepatische Cholesterol-Synthese nahezu komplett inhibiert und erst 1-9 Stunden später wieder auf Ausgangsniveau gestiegen.<sup>72</sup>

#### A. IV. 3. Studienlage

Die Wirkung und Effizienz von Rosuvastatin, dem neuesten unter den Statinen, wurde in drei großen Studien an Patienten mit Diabetes untersucht:

**URANUS** (Use of Rosuvastatin vs. Atorvastatin in type 2 diabetes mellitus), **ANDROMEDA** (A randomized, Double-blind study to compare Rosuvastatin [10 & 20 mg] and atorvastatin [10 & 20 mg] in patients with type II Diabetes) und **CORALL** (Compare Rosuvastatin [10-40 mg] with Atorvastatin [20-80 mg] on apo B/apo A-1 ratio in patients with type 2 diabetes mellitus and dyslipidaemia). Die Daten von URANUS und

ANDROMEDA ergaben, dass Rosuvastatin den LDL-C-Wert effektiver reduziert und die Behandlungsziele effektiver erreicht als Atorvastatin. CORALL identifizierte Rosuvastatin in den Dosierungen von 10, 20 und 40 mg retrospektiv als effektiver in der Senkung der LDL-C-Spiegel als 20, 40 und 80 mg Atorvastatin.<sup>73</sup>

Auch in der **MERCURY I** (Measuring Effective Reductions in Cholesterol Using Rosuvastatin Therapy) -Studie zeigte sich Rosuvastatin im Bereich der 10-40 mg Dosis effizienter in Bezug auf die Senkung des LDL-C-Blutspiegels und einer Anhebung des HDL-C-Spiegel als andere Statine in ihrer üblichen Dosierung.

In weiteren Studien wurde für Rosuvastatin eine antiinflammatorische Wirkung über eine Hemmung der Leukozyten-Endothel-Interaktion nachgewiesen, indem es dosisabhängig das so genannte „Leukozyten-Rollen“, die Adhäsion am Endothel und die Transmigration der Leukozyten in das Interstitium verminderte.

Passend dazu waren Ergebnisse, die für Rosuvastatin eine signifikante Reduktion der P-Selektin-Expression, sowie eine Steigerung der NO-Freisetzung (direkt in der Aorta gemessen) in immunchemischen Untersuchungen nachgewiesen haben.<sup>74</sup>

## **A. V. Zielsetzung**

Verschiedenste kardiovaskuläre Therapie-Leitlinien empfehlen, Patienten mit Typ 2 Diabetes als Hochrisikogruppe für die Entwicklung einer CVD einzustufen und sie daher einer Therapie zur LDL-C-Senkung unter 100 mg/dl zuzuführen.<sup>75</sup> Neuste Empfehlungen fordern sogar eine LDL-C-Senkung unter 70 mg/dl für Hochrisiko-Patienten mit Diabetes und symptomatischer CVD.<sup>76</sup> Doch bei einem Drittel aller Patienten, die zur Primär- oder Sekundär-Prävention mit LDL-C senkenden Medikamenten behandelt werden, wird die empfohlenen Höchstgrenze nicht erreicht.<sup>70</sup> Dies verdeutlicht, dass die Etablierung effizienter Lipid-Senker einen hohen Anreiz in der Forschung darstellt.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Rosuvastatin auf vaskuläre Funktionen bei Diabetes im Tiermodell zu untersuchen und dadurch eine mögliche Effizienz in Bezug auf zukünftige Therapie und Prävention kardiovaskulärer Komplikationen im Rahmen der Volkskrankheit Diabetes mellitus aufzuzeigen.

## **B. Methoden**

### **B. I. Versuchstiere**

Alle Versuche an Tieren erfolgten unter Einhaltung der Haltungs- und Verwendungsvorschriften von Labornutztieren der US National Institutes of Health (NIH Publikation Nr. 85-23, revidiert 1996), sowie den aktuellen Richtlinien der Universität Würzburg. Für alle Versuche wurden ausschließlich männliche Wistar Ratten mit einem Ausgangsgewicht von 250- 300g, bezogen von der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland, verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Temperatur-kontrollierten Bedingungen (20- 22°C) und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Jeweils 4-5 Tiere waren in einem Käfig mit freiem Zugang zu Futter und Wasser untergebracht.

### **B. II. Induktion des Diabetes**

Es wurden bei insgesamt 22 Tieren die Inselzellen des Pankreas irreversibel zerstört und dadurch eine persistierende Hyperglykämie erzeugt. STZ (10 mg/ml, Sigma, Deisenhofen, Germany) wurde in sterilem Natrium-Zitrat Puffer (0.025 mol/l, pH 4.5) gelöst und innerhalb von 10 Minuten verwendet. Für die Injektion der STZ-Lösung von 50 mg/kg Körpergewicht wurden die Ratten mittels eines Isofluran-Verneblers kurzzeitig narkotisiert. Die Kontrollgruppe erhielt eine einmalige intravenöse Injektion eines gleichgroßen Volumens Zitrat-Puffer. Der Blutzucker der Tiere wurde jeweils vor, bzw. zwei und vier Wochen nach der STZ-Injektion über eine „one-touch“ Blutzuckermessung (Ascensea Elite, Bayer-Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) mit einem Blutstropfen nach oberflächlicher Inzision aus dem Schwanz der Tiere bestimmt. In die Studie eingeschlossen wurden nur diejenigen Tiere, welche zwei und vier Wochen nach STZ-Injektion einen Blutzuckerwert von mindestens 20mmol/l aufwiesen.

### **B. III. Rosuvastatin-Therapie**

Am 14. Tag nach STZ-Injektion erfolgte eine randomisierte Zuteilung der Ratten in Placebo- oder Rosuvastatin-behandelte Gruppen. Letztere erhielten 20 mg/kg Rosuvastatin (Astra-Zeneca) pro Tag, gelöst in einer Emulsion aus Gummi-arabicum und destilliertem Wasser via Schlundsonde. Diese Dosis bewirkt bei den Tieren erfahrungsgemäß eine 90%ige Inhibition

der HMG-CoA-Reduktase.<sup>21</sup> Der Kontrollgruppe wurde ebenfalls via Schlundsonde eine gewichtsadaptierte Lösung aus Gummi-arabicum und destilliertem Wasser verabreicht. Zwei Wochen nach Therapiebeginn wurden Gefäßfunktion und Thrombozytenaktivität gemessen.

#### **B. IV. Gefäßpräparation und Thrombozyten-Gewinnung**

Zur Präparation der Aorta wurden die Ratten mit 5%-Isofluran-Inhalation anästhesiert und die Schmerzfreiheit unter Spontanatmung durch Schmerzreize überprüft. Nach Eröffnung des Abdomens wurde eine Blutprobe durch direkte Punktion der Vena cava inferior gewonnen und in einem mit 3.8% Natrium-Zitrat Lösung versehenem Röhrchen aufgefangen. Es folgten die Eröffnung des Thorax und die Entnahme des Herzens unter Durchtrennung der großen Gefäße. Bis zur Entnahme des Herzens wurde die Narkose der Tiere durch eine Isofluran-Maske weiterhin aufrechterhalten. Anschließend wurde die gesamte Aorta freipräpariert. Der Aortenbogen wurde abgetrennt und das Gefäß bis zum Zwerchfell unter Vermeidung von Druck oder Zug entnommen. Die Aorta wurden in Krebs-Henseleit-Lösung (NaCl 118 mmol/l, KCl 4.7 mmol/l, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> 1.6 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mmol/l, NaHCO<sub>3</sub> 25 mmol/l, Glucose 12 mmol/l; pH 7.4, 37°C) gebracht und das Lumen mehrfach durchspült, um einer Thrombosierung des Gefäßes vorzubeugen. Die Pars descendens/thoracalis der Aorta wurde unter dem Mikroskop von umgebendem Fett- und Bindegewebe frei präpariert, im Anschluss noch einmal intraluminal durchspült und mit einem Skalpell in etwa fünf Millimeter breite Ringe geschnitten. Ein Stück wurde für die Messung der O<sub>2</sub><sup>-</sup> Produktion im Luminometer (Typ Wallac, Freiburg, Deutschland) verwendet, ein weiteres in drei Millimeter breite Ringe zerteilt und für die Messung der isometrischen Kontraktion im Organbad (FMI, Seeheim, Deutschland) aufgehängt.

#### **B. V. Luminometer**

Nach der Gefäßpräparation wurden die Aortenringe für 30 Minuten in einem HEPES-modifizierten Krebs-Puffer, pH 7.40, Temperatur 37°C inkubiert und direkt im Anschluss die quantitativen Superoxid-Produktion am Luminometer während 60 Sekunden gemessen. Das verwendete Luminometer registriert die Lichtreaktionen zwischen den Superoxid-Molekülen

und Lucigenin (5 $\mu$ mol/l) während der Inkubation.<sup>77</sup> Die generierten Chemilumineszenz-Signale wurden angegeben als counts per minutes (cpm).

Nach den Messungen wurden die Gefäßringe im Inkubator bei 60°C für 7 Tage getrocknet und das Trockengewicht anschließend mit einer Feinwaage bestimmt. Durch die jeweilige Signalintensität [cpm] bezogen auf das dazu gehörige Trockengewicht [mg] konnte die spezifische Superoxid-Produktion der einzelnen Gefäße bestimmt werden.

## **B. VI. Organbad**

Die Versuche zur Bestimmung der vasomotorischen Funktionen erfolgten im Organbad. Hierfür ruhten die Aortenringe zunächst 30 Minuten unter einer anliegenden passiven Vordehnung von 2 g in einer oxygenierten (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>) Krebs-Henseleit-Lösung, welche zusätzlich mit 1  $\mu$ mol/l Diclofenac versetzt wurde. Die Ringe wurden solange wiederholt mittels KCl (maximal 100 mmol/l) kontrahiert, bis eine reproduzierbare Antwort erreicht wurde. Die Darstellung der Kontraktionsantwort-Kurve erfolgte durch kumulative Konzentrationen von Phenylephrin.

Die Relaxations-Antwort auf kumulative Konzentrationen von Acetylcholin wurde bestimmt, nachdem eine Vorkontraktion der Gefäße (durch Phenylephrin) auf vergleichbare Niveaus erfolgt war (Kontrollen: 1.28 $\pm$ 0.04g, STZ-Placebo: 1.28 $\pm$ 0.06g, STZ-Rosuvastatin: 1.28 $\pm$ 0.09g). Anschließend wurden die Aortenringe auf etwa 20% der Maximalkontraktion über die Gabe geringer, aber ansteigender Konzentrationen Phenylephrins vorkontrahiert. Die zusätzlich gemessene Kontraktion auf die darauf folgende N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin- (L-NNA) Gabe diente als Marker für die physiologische, dehnungs-induzierte, kalzium-unabhängige NO-Freisetzung.<sup>78</sup> Darüber hinaus wurde die Relaxations-Antwort auf den Endothel-unabhängigen Vasodilatator 2-(N,N-Diethylamino)-diazonolot-2-oxide (DEA-NONOate, Alexis Biochemicals, San Diego, CA) nach Vorkontraktion mittels Phenylephrin in Anwesenheit von L-NNA bestimmt.

## **B. VII. Konfokalmikroskopie**

Ein qualitativer Nachweis der gesteigerten Superoxid-Produktion der Gefäßringe in situ erfolgte durch eine Bestimmung des relativen Fluoreszenzniveaus in den verschiedenen Versuchsgruppen, erzeugt durch den Farbstoff Hydroethidin (HE).<sup>77</sup> Hierfür wurden Gefrierschnitte der Aortenringe angefertigt: jeweils ein Gefäßring wurde in einem Tropfen

Tissue-Tek® in einer Petrischale (Ø3,5 cm) eingebettet und mit in flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren. Bis zur endgültigen Verwendung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt. Aus diesen Proben wurden 10 µm dicke Kryoschnitte mit einem Kryotom gefertigt und auf einen Objektträger gebracht. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte mit dem Superoxid-sensitiven Farbstoff HE versehen und für 30 Minuten in einer Lichtgeschützten Feuchtkammer bei 37°C inkubiert. Bei der Oxidation zu Ethidiumbromid durch Superoxid sendet HE ein Fluoreszenzsignal aus. Die durch dieses Signal erzeugten Bilder wurden mit einem Bio-Rad MRC-1024 Laser-Scanning Konfokalmikroskop, welches mit einem Krypton/Argon Laser ausgestattet ist, erstellt. Das Fluoreszenzsignal wurde mit einem 585-nm long-pass Filter gemessen und mittels NIH ImageJ analysiert. Die Aufnahmen der Bilder von Gefäßen aus der Kontrollegruppe, der STZ-Placebo-Gruppe und den mit Rosuvastatin behandelten Tieren wurden unter identischen Lasereinstellungen vorgenommen und parallel gemessen.

## **B. VIII. Durchflusszytometrie**

Das bei der Gefäßpräparation aus der Vena cava gewonnene Blut wurde mit PBS (Phosphate Buffered Saline; frei von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , angereichert mit D-Glukose [5.5 mmol/l] und 0.5% BSA [bovines Serum-Albumin]) verdünnt. Der an die Thrombozyten gebundene Fibrinogen-Anteil wurde durch eine 10 minütige Inkubation mit FITC-(Fluoresceinisothiocyanat) markiertem Anti-Fibrinogen-Antikörpern (WAK-Chemie, Bad Soden, Deutschland)<sup>55</sup> bestimmt. Für die Bestimmung des an der Oberfläche exprimierten P-Selektins wurde das verdünnte Blut mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-P-Selektin-Antikörper für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß folgte die Inkubation mit FITC-markiertem Ziegen-anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania). Die Proben wurden ebenfalls in Abwesenheit des ersten Antikörpers nur mit dem FITC-gekoppelten zweiten Antikörper gefärbt. Ein anti-Ratten CD42 monoklonaler FITC-konjugierter Antikörper (Becton Dickinson) wurde als Thrombozyten-spezifischer Marker zur Bestimmung zirkulierender Thrombozyten-Mikropartikel (PMP) verwendet. Die CD42-Expression war signifikant höher bei Thrombozyten von kontroll- vs. diabetischen Tieren, so dass gesunde Kontrollen in die Bewertung der PMP's nicht einbezogen wurden. Die CD42-Expression war innerhalb der beiden diabetischen Gruppen jedoch nicht signifikant unterschiedlich (Daten nicht aufgeführt). Der Inkubation mit den Antikörpern folgte die Fixierung der Thrombozyten mittels Methanol-freiem Formaldehyd (1.5%) für 10 Minuten,

sowie die Analyse in einem Becton Dickinson FACSCalibur bei niedriger Flussrate. Die Thrombozyten Population wurde aufgrund ihres vorwärts- sowie seitwärts-Streulichtverhaltens identifiziert, und je 20.000 Ereignisse wurden nach mittlerer Fluoreszenz mit CELLQuest Software, Version 3.1f analysiert; unspezifische Bindungen wurden willkürlich an eine mittlere Fluoreszenz von 10 angepasst und visuell aus dem Graphen subtrahiert.

## **B. IX. Substanzen**

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien in der höchst möglich verfügbaren Reinheit von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

## **B. X. Statistik**

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. „n“ repräsentiert die Anzahl aller in den einzelnen Versuchsgruppen einbezogener Tiere. Die Kontraktionen und Relaxationen der Gefäße wurden in Gramm registriert. Die Relaxation ist prozentual im Verhältnis zum Grad der Vorkontraktion angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch wiederholte Varianzanalysen (ANOVA; analysis of variance) und multiple Tukey-Kramer Vergleichs-Tests. Die  $O_2^-$  Bildung wurde mittels ANOVA, gefolgt von einem Tukey post-hoc Test, analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant angenommen.

## C. Ergebnisse

### C. I. Basisdaten und Einschlusskriterien der Versuchsgruppen

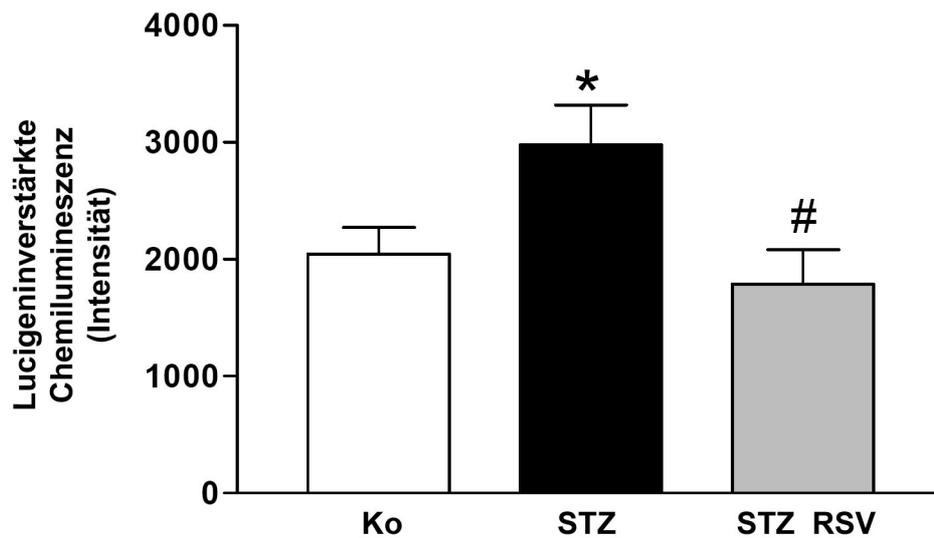
Blutglukose-Werte, Körpergewicht, sowie Anzahl der Thrombozyten und Leukozyten der Tiere sind in Tabelle 1 dargestellt. In die Studie eingeschlossen wurden nur diejenigen Tiere, welche zwei und vier Wochen nach STZ-Injektion einen Blutglukosewert von mindestens 20mmol/l aufwiesen.

	Kontrollen Placebo	STZ Placebo	STZ RSV
n	10	12	10
Blut-Glukose [mmol/l]	9.6±0.9	27.6±0.6**	26.3±1.3**
Körpergewicht [g]	354±6	243±4**	255±10**
Thrombozyten [x1000/µl]	660±40	545±47	599±60
Leukozyten [x1000/µl]	5.7±0.3	4.9±0.5	4.7±0.3

**Tab. 1:** Mittelwerte von Blutzucker, Körpergewicht, Anzahl der Thrombozyten und Anzahl der Leukozyten aller in die Studie einbezogener Tiere. \*\* $p < 0.01$  vs. Kontrollen.

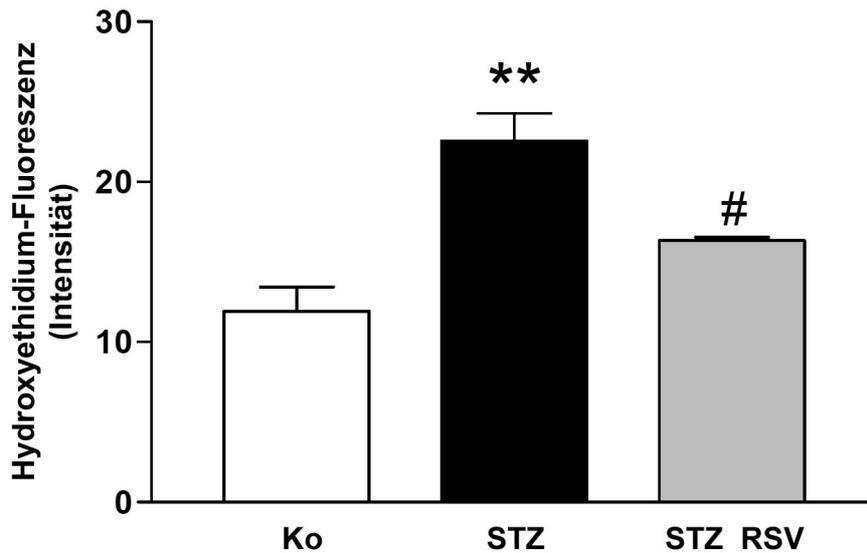
### C. II. Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies in den Gefäßen

Die quantitative  $O_2^-$ -Produktion in der Aorta wurde anhand Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz bestimmt. Bei Ratten mit Diabetes war die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies in den Gefäßen signifikant erhöht und normalisierte sich unter der Therapie mit Rosuvastatin (Abb.7).



**Abb.7:** *Quantitativer Superoxid-Nachweis: Vergleich der Superoxid-Bildung in Gefäßen von Kontrollen (Ko), von diabetischen Tieren (STZ) und diabetischen Tieren nach Rosuvastatin (RSV) Therapie mittels Lucigenin (5µmol/l)-verstärkter Chemilumineszenz während 60 Sekunden. Bei diabetischer Stoffwechsellage zeigte sich eine gesteigerte Superoxidproduktion in den Gefäßringen, welche durch Rosuvastatin-Therapie auf Kontrollniveau gesenkt wurde. \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle; # $p < 0.05$  vs. STZ-Placebo*

Ergänzend zu der Bestimmung der quantitativen Superoxid-Bildung erfolgte der qualitative Nachweis von ROS mittels HE-Fluoreszenz. Es zeigte sich eine erhöhte Fluoreszenz-Intensität in den diabetischen Aortenringen, welche nach Rosuvastatin-Behandlung jedoch reduziert und an das Kontroll-Niveau angenähert war (Abb.8).



**Abb.8:** Qualitative Darstellung der *in situ* Superoxid-Produktion der Gefäßrinne: Bestimmung des relativen Fluoreszenzniveaus mit Hydroethidin (HE). Auch hier zeigte sich eine gesteigerte Superoxid-Formation in den diabetischen Gefäßringen, sowie ein Rückgang des Superoxid-Niveaus nach Rosuvastatin-Therapie. \*\* $p < 0.01$  vs. der Kontrolle; # $p < 0.05$  vs. STZ-Placebo

Repräsentative mikrotopographische Bilder der qualitativen  $O_2^-$ -Anreicherung in den Gefäßringen demonstrieren eine relativ erhöhte Signal-Intensität bei diabetischen Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Intensität des Signals war bei den Rosuvastatin-behandelten Tieren deutlich reduziert (Abb.9).



**Abb.9:** Qualitativer Superoxid-Nachweis: Konfokalmikroskopische Bilder 10 $\mu$ m dicker Aortenring-Segmente nach Inkubation mit Hydroethidium zur Visualisierung der  $O_2^-$ -Anreicherung im Bereich der gesamten Gefäßwand. Die Bilder zeigen einen relativen Anstieg der Signalintensität durch vermehrte Superoxid-Bildung in den Gefäßringen diabetischer Tiere (STZ Placebo) verglichen mit der Kontrollgruppe (Ko) und der mit Rosuvastatin (STZ RSV) behandelten Gruppe.

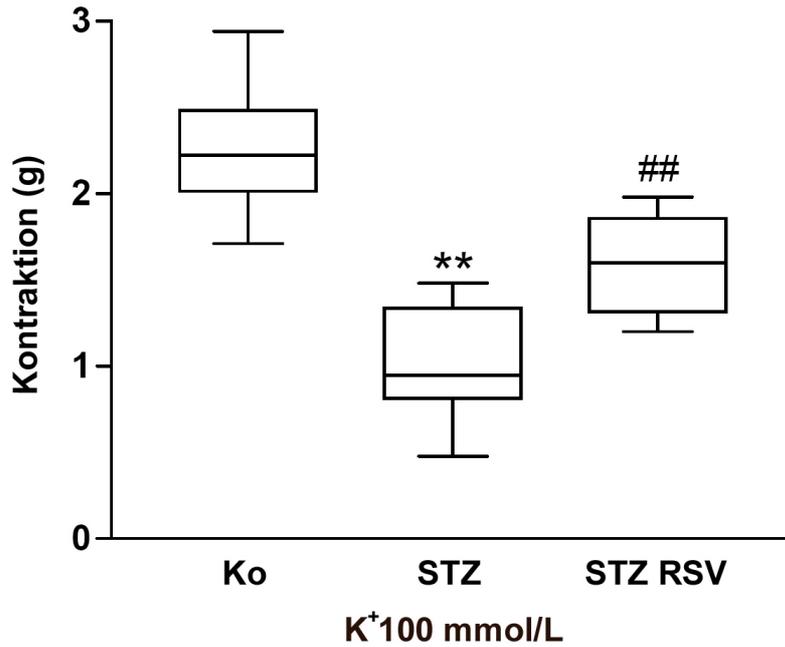
Diese Untersuchungen unterstützen die Ergebnisse der aus den HE-Fluoreszenz-Versuchen gewonnenen These eines spezifischen ROS-Nachweises in den Aortensegmenten. Darüber hinaus veranschaulichen die konfokalmikroskopischen Bilder, dass sich die erhöhte ROS-Bildung nicht nur im Bereich des Endothels, sondern in der gesamten Gefäßwand nachweisen lässt.

Nachdem in diesem ersten Schritt die Identifikation eines erhöhten ROS-Niveaus in den Gefäßwänden diabetischer Tiere bzw. eine deutliche Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies in der Rosuvastatin-therapierten Gruppe erfolgt war, wird durch die folgenden Versuchsanordnungen die Auswirkung einer erhöhten ROS-Konzentration auf die vasomotorische Funktion der betroffenen Gefäßsegmente veranschaulicht.

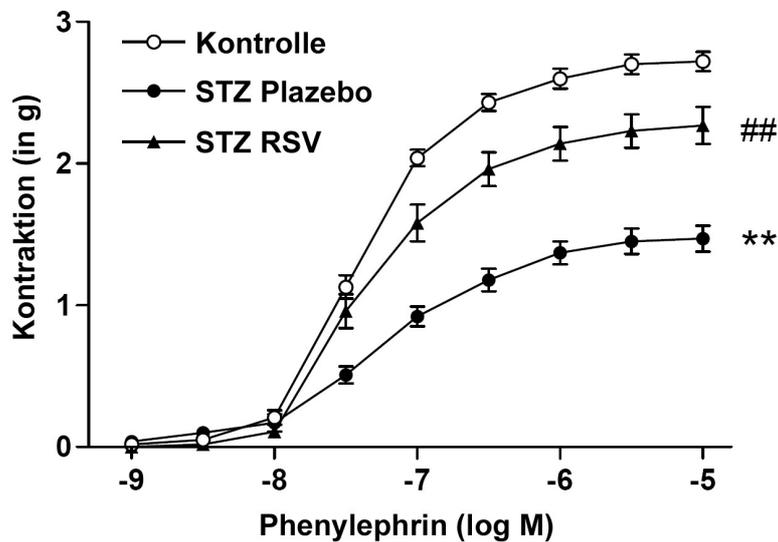
### **C. III. Vasomotorische Funktion**

#### **C. III. 1. Kontraktion**

Die kontraktile Antwort auf Kalium (100 mmol/l; Abb.10) bzw. ansteigende Konzentrationen (Abb.11) des alpha-adrenergen Rezeptoragonisten Phenylephrin waren in der Aorta diabetischer Ratten signifikant vermindert und nach Rosuvastatin-Langzeittherapie deutlich verbessert.



**Abb.10:** Die vasomotorische Funktion nach Gabe von Kalium (100 mmol/l) zeigt eine Verminderung der Kontraktions-Antwort in der diabetischen Versuchsgruppe, sowie eine Verbesserung der Kontraktionsfähigkeit nach Rosuvastatin-Behandlung. \*\* $p < 0.01$  vs. Kontrolle; ## $p < 0.01$  vs. STZ-Placebo



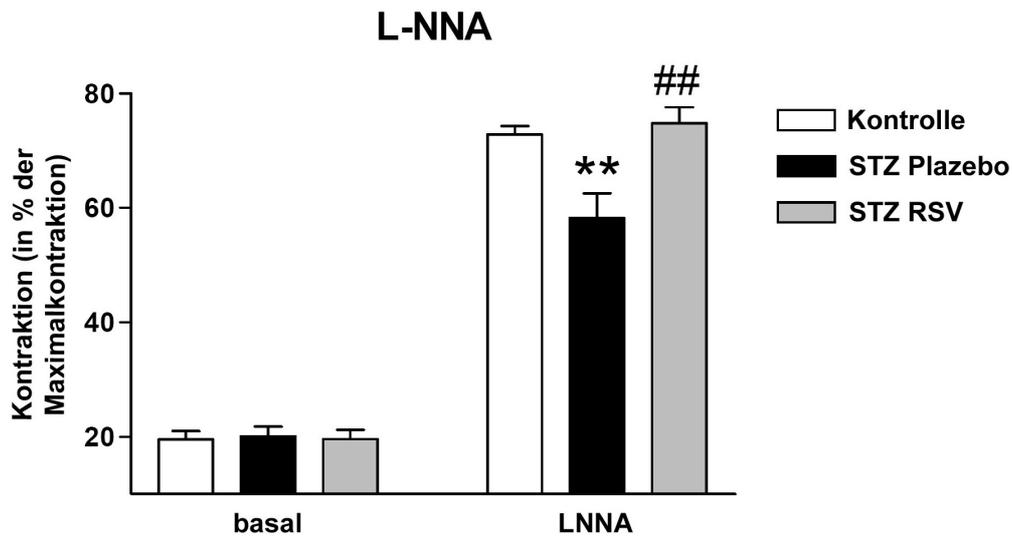
**Abb.11:** Auf kumulative Konzentrationssteigerungen mit Phenylephrin erreicht die Kontraktionskurve der diabetischen Versuchsgruppe einen niedrigeren Maximalwert als die der Kontroll- und der mit Rosuvastatin behandelten Gruppe. \*\* $p < 0.01$  vs. Kontrolle; ## $p < 0.01$  vs. STZ-Placebo

Ein Vergleich der Versuchsgruppen bezüglich der mittleren effektiven Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) von Phenylephrin sowie der maximalen Kontraktion ( $K_{max}$ ) zeigt Tabelle 2. Als  $EC_{50}$  wird die Phenylephrin-Konzentration bezeichnet, bei der ein halbmaximaler Effekt, in diesem Fall die halbe maximale Kontraktion ( $\frac{1}{2}K_{max}$ ), beobachtet wird.

	Kontrollen	STZ-Placebo	STZ-RSV
$K_{max}$ [g]	2.7±0.1	1.5±0.1 <i>p&lt;0,01</i>	2.3±0.1 <i>p&lt;0,01</i>
$EC_{50}$ [nmol/l]	49.3±2.8	90.8±17.8 <i>p&lt;0,01</i>	53.9±6.0 <i>p&lt;0,05</i>

**Tab.2:** Mittelwert der erzielten maximalen Kontraktion ( $K_{max}$ ) der Gefäße und der mittleren effektiven Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) von Phenylephrin innerhalb der unterschiedlichen Untersuchungsgruppen ±Standardfehler.

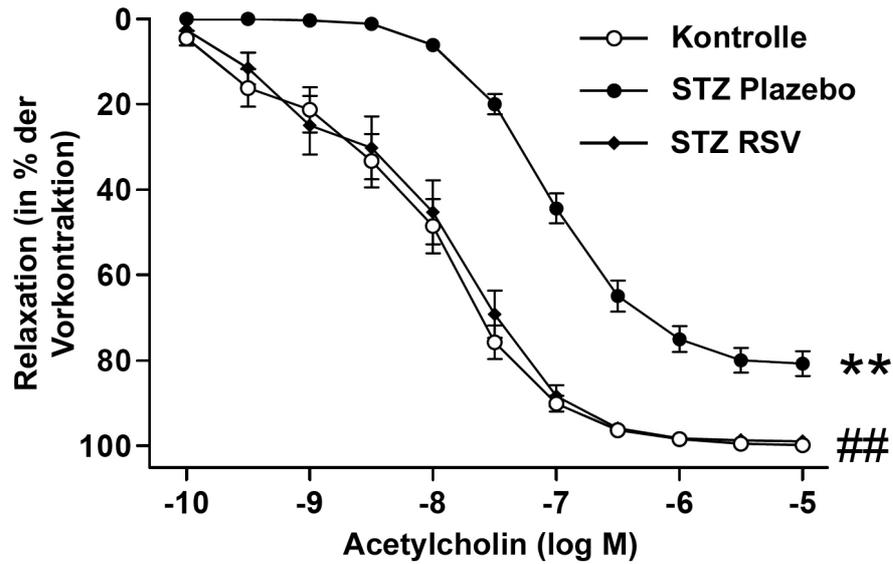
Da eine verminderte Kontraktion potentiell auch Ausdruck einer exzessiv gesteigerten NO-Freisetzung sein könnte, wurden die Aortenringe auf 20% ihrer Maximalkontraktion vorkontrahiert und anschließend die NO-Synthese mittels des NOS-Inhibitors L-NNA ( $N^G$ -Nitro-L-Arginin) wie bereits zuvor beschrieben inhibiert.<sup>78</sup> In den Gefäßen gesunder Kontrolltiere führte eine derartige Vorkontraktion zu einer starken NO-Freisetzung, aus der Gabe des NOS-Hemmers LNNA resultierte folglich eine deutliche Kontraktion (Abb.12). In Gefäßen diabetischer Tiere war die zusätzlich erzeugte Kontraktion abgeschwächt, so dass eine vermehrte NO-Freisetzung als Grund für die reduzierte Kontraktionsfähigkeit ausgeschlossen werden konnte. In Rosuvastatin behandelten diabetischen Tieren war die L-NNA-induzierte Konstriktion mit Werten der Kontrollgruppe vergleichbar (Abb.12).



**Abb.12:** Kontraktion der Gefäße bei 20% des Maximalwertes (basal) und Kontraktion nach L-NNA Applikation (L-NNA). Eine exzessiv gesteigerte NO-Freisetzung als Ursache einer reduzierten Kontraktionsfähigkeit konnte hiermit ausgeschlossen werden. \*\* $p < 0.01$  vs. Kontrolle; ##  $p < 0.01$  vs. STZ-Placebo

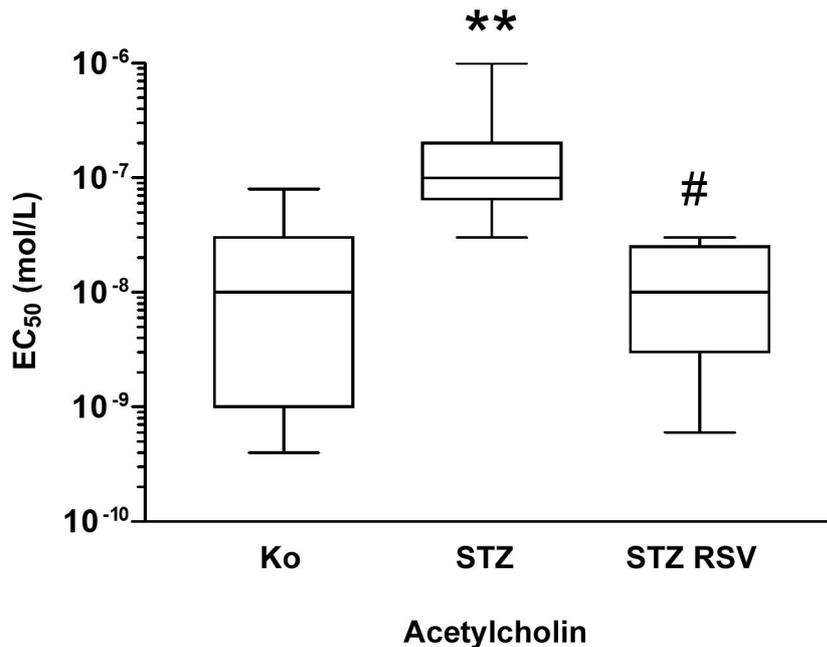
### C. III. 2. Relaxation

Da die Messung der durch NOS-Inhibition erzeugten Kontraktion eher eine reduzierte NO-Bildung in den Aorten diabetischer Tiere nahe legte, wurde die Endothelfunktion im Rahmen der folgenden Versuchsanordnungen mittels Agonisten-induzierter und Rezeptor-vermittelter eNOS-Stimulation durch steigende Konzentrationen von Acetylcholin geprüft. Die Verabreichung von Acetylcholin zur Kalzium-abhängigen Aktivierung der eNOS induzierte eine Endothel-abhängige Vasorelaxation, welche bei diabetischer Stoffwechsellage beeinträchtigt war und durch die Behandlung mit Rosuvastatin signifikant verbessert werden konnte (Abb.13).



**Abb.13:** Effekt kumulativer Konzentrationen von Acetylcholin auf die Relaxation der Gefäßringe. In der diabetischen Versuchsgruppe wird eine Rechtsverschiebung, sowie ein erniedrigter Maximalwert beobachtet. Nach Rosuvastatin-Therapie erfolgte eine Anpassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve an das Kontroll-Niveau.  $**p < 0.01$  vs. Kontrolle;  $##p < 0.01$  vs. STZ-Placebo

Des Weiteren wurden die Versuchsgruppen bezüglich der mittleren effektiven Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) von Acetylcholin verglichen (Abb. 14).



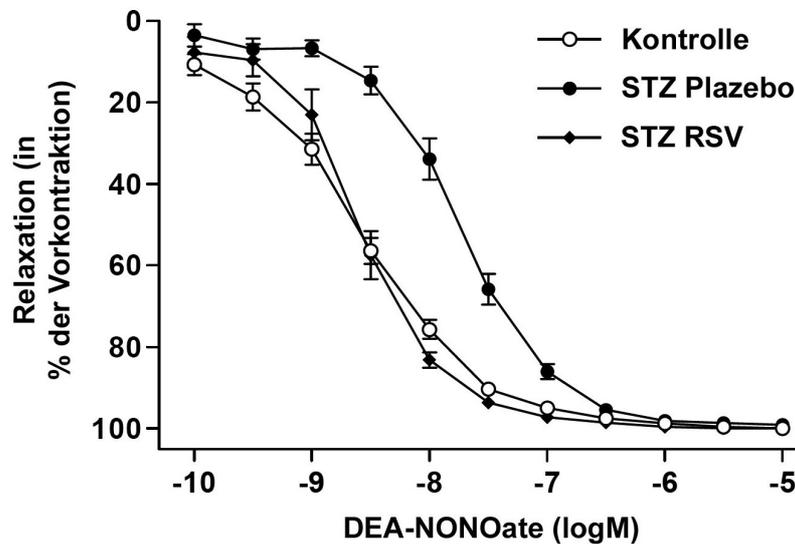
**Abb.14:** Vergleich der mittleren effektiven Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) nach Verabreichung kumulativer Konzentrationen von Acetylcholin. In der diabetischen Versuchsgruppe wurden höhere Konzentrationen zur Auslösung der halben maximalen Relaxation  $R_{max}$  der Gefäße benötigt, als in der Kontroll- und der Rosuvastatin-behandelten Gruppe. \*\* $p < 0.01$  vs. Kontrolle; #  $p < 0.05$  vs. STZ-Placebo

	Kontrollen	STZ-Placebo	STZ-RSV
$R_{max}$ [%]	99.8±0.2	80.7±2.9 $p < 0.01$	98.9±0.7 $p < 0.01$
$EC_{50}$ [nmol/l]	18.5±4.4	189.2±50.6 $p < 0.01$	13.4±3.4 $p < 0.05$

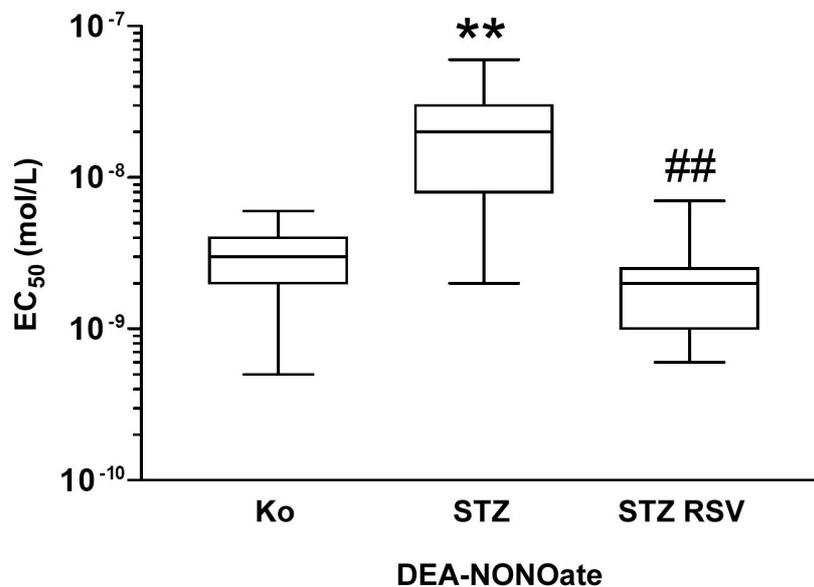
**Tab.3:** Mittelwerte der erzielten  $R_{max}$  der Gefäße und der  $EC_{50}$  von Acetylcholin innerhalb der unterschiedlichen Untersuchungsgruppen ±Standardfehler.

Die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve nach Acetylcholin-Applikation sowie ihre zusätzlich verminderte Maximalantwort legen nahe, dass nicht nur weniger NO in diabetischen Gefäßringen gebildet wurde, sondern auch eine Desensitivierung der glatten Gefäßmuskulatur für NO vorliegen könnte. Daher wurde die Sensitivität der glatten Gefäßmuskulatur für NO überprüft, indem die Aortenringe mit steigenden Konzentrationen einer konstant NO-freisetzenden Substanz stimuliert wurden. Die Konzentrations-Wirkungskurve des NO-Donors DEA-NONOate, welcher verwendet wurde um die Endothel-unabhängige Vasorelaxation zu bestimmen, war bei den Gefäßen unbehandelter diabetischer Tiere nach rechts verschoben. Die Endothel-unabhängige Relaxation der Aortenringe von

Rosuvastatin-behandelten diabetischen Ratten war signifikant nach links zurück versetzt und nahezu deckungsgleich mit der Kurve der Kontrollen (Abb.15 und 16).



**Abb.15:** Effekt kumulativer Konzentrationen des NO-Donors DEA-NONOate auf das Relaxationsvermögen der Gefäßringe. Beeinträchtigung der Endothel-unabhängigen Vasorelaxation bei diabetischen Tieren, sowie Rückverlagerung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve auf Kontroll-Niveau bei diabetischen Tieren nach Rosuvastatin-Behandlung.



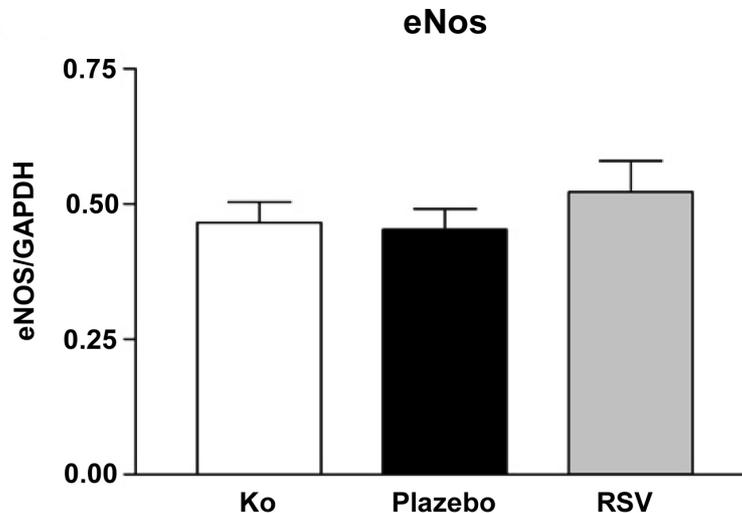
**Abb.16:** Vergleich der mittleren effektiven Konzentrationen  $EC_{50}$  auf kumulative Dosen von DEA-NONOate. In der diabetischen Versuchsgruppe wurden höhere Konzentrationen zur Auslösung der halben maximalen Relaxation der Gefäße benötigt, als in der Kontroll- oder der mit Rosuvastatin behandelten diabetischen Gruppe. \*\* $p < 0.01$  vs. Kontrolle; ## $p < 0.01$  vs. STZ-Placebo

	Kontrollen	STZ-Plazebo	STZ-RSV
$R_{max}$ [%]	100.0±0.0	99.1±0.7 <i>nicht signifikant</i>	100.0±0.0 <i>nicht signifikant</i>
$EC_{50}$ [nmol/l]	2.8±0.4	20.1±2.9 $p < 0.01$	2.5±0.6 $p < 0.01$

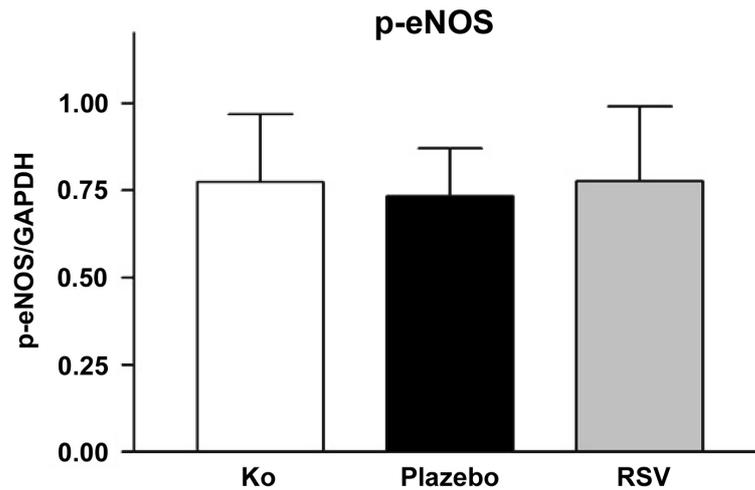
**Tab.4:** Mittelwerte der erzielten  $R_{max}$  der Gefäße und der  $EC_{50}$  von DEA-NONOate innerhalb der unterschiedlichen Untersuchungsgruppen ±Standardfehler.

#### C. IV. eNOS-Expression

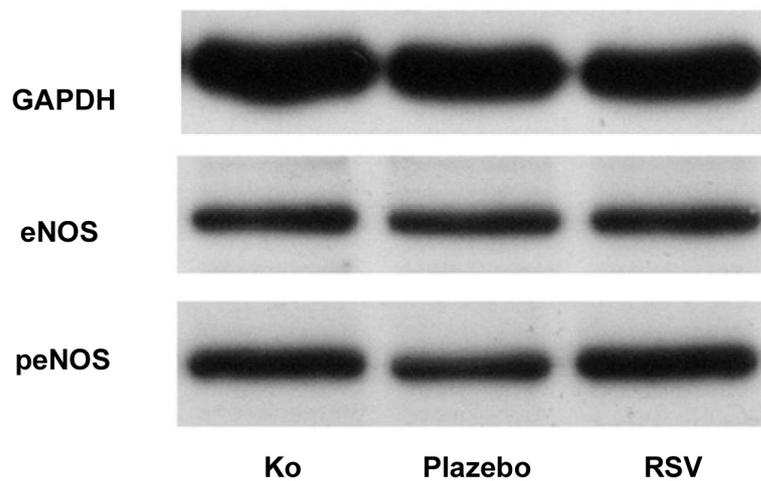
In dieser Studie konnten keine signifikanten Veränderungen der eNOS-Expression oder Aktivierung festgestellt werden, weder infolge der Induktion des Diabetes noch durch eine Rosuvastatin-Langzeittherapie. In repräsentativen Western Blots für eNOS, Phospho-eNOS (p-eNOS) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wichen weder die eNOS-Protein-Expression (Abb. 17 und 19), noch die eNOS-Phosphorylierung (Abb. 18 und 19) an Serin innerhalb der drei Versuchsgruppen voneinander ab.



**Abb.17:** Darstellung der eNOS-Protein-Expression. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der verschiedenen Untersuchungsgruppen.  $p > 0.05$



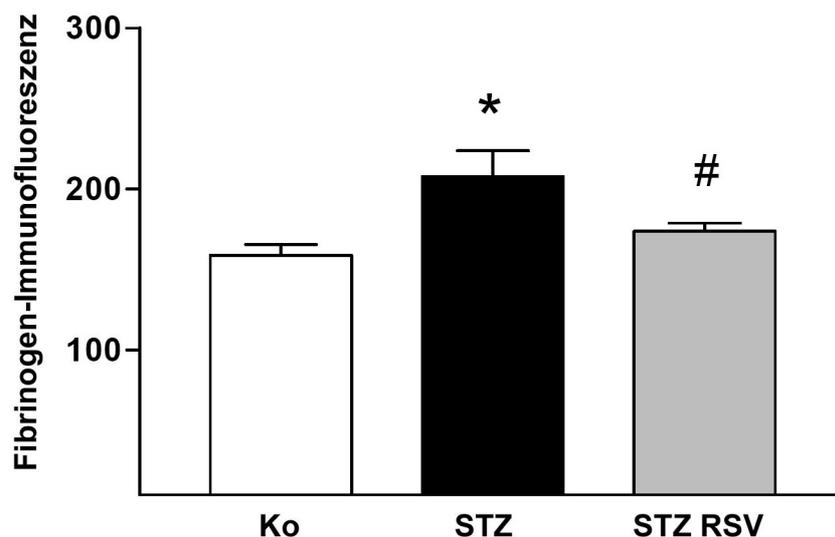
**Abb.18:** Darstellung der eNOS-Phosphorylierung (p-eNOS). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der verschiedenen Untersuchungsgruppen.  $p > 0.05$



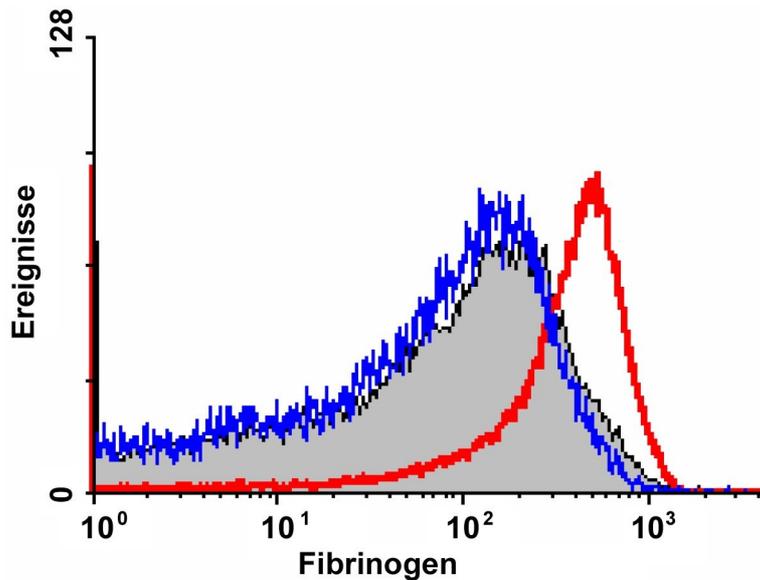
**Abb.19:** Repräsentative Western Blots zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der eNOS-Expression sowie der eNOS-Phosphorylierung an Serin 1177 innerhalb der Untersuchungsgruppen.  $p > 0.05$ ,  $n = 6$ .

### C. V. Thrombozyten-Aktivierung

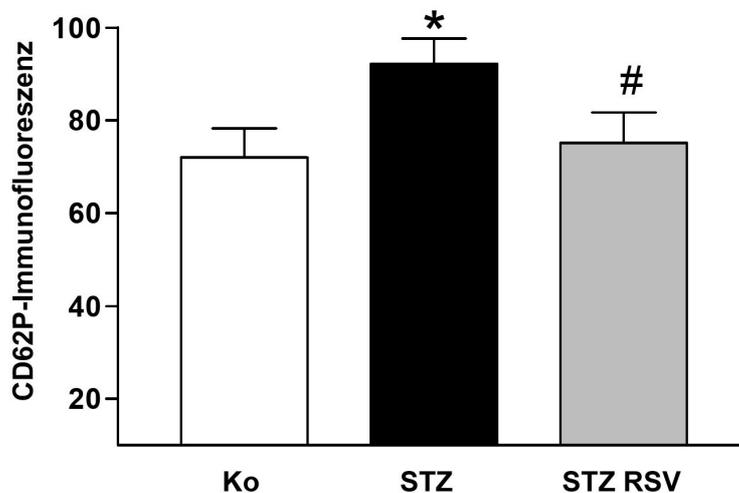
Da es besonders bei Diabetes im Rahmen einer Endotheldysfunktion zu einer Aktivierung zirkulierender Thrombozyten kommt und dies durch den Erhalt der Endothelfunktion in diabetischen Tieren verhindert werden konnte<sup>77</sup>, untersuchten wir, in wieweit die chronische Therapie diabetischer Ratten mit Rosuvastatin neben einer Verbesserung der Endothelfunktion zu einer Modulation der Thrombozytenaktivierung führt. Das Maß der in vivo-Aktivierung von Thrombozyten in unstimuliertem Vollblut der Versuchstiere wurde zum einen durch die Bestimmung des an Thrombozyten gebundenen Fibrinogens gemessen, was ein Maß für die Aktivierung des membranständigen Glykoproteins IIb/IIIa ist (Abb.20 und 21); als zweiter Marker der Thrombozytenaktivierung diente die Bestimmung der Oberflächen-Expression von P-Selektin als ein Indikator der Thrombozyten-Degranulation (CD62P, Abb.22).



**Abb.20:** Durchflusszytometrische Bestimmung des an Thrombozyten gebundenen Fibrinogens (Immunfluoreszenz), was ein Maß für die Aktivierung des membranständigen Glykoproteins IIb/IIIa und dadurch indirekt auch ein Maß für die Thrombozyten-Aktivierung ist. \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle; # $p < 0.05$  vs. STZ-Placebo



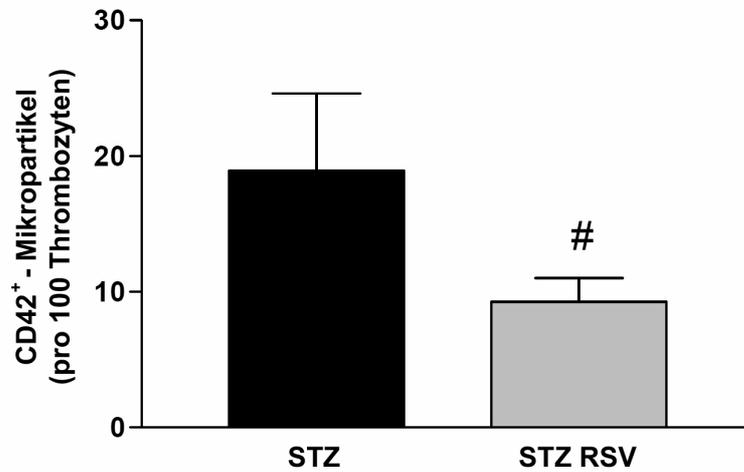
**Abb.21:** Typisches durchflusszytometrisches Histogramm der vermehrten Fibrinogenbindung an aktiviertes Glykoprotein IIb/IIIa bei unbehandelten diabetischen Ratten (rot) gegenüber gesunden Kontrollen (grau). Die Therapie diabetischer Tiere mit Rosuvastatin (blau) führt zu einer Rückverlagerung der Fluoreszenzintensität auf Kontrollniveau.



**Abb.22:** Grad der Thrombozyten-Degranulation gemessen an der Oberflächenexpression von P-Selektin (CD62P Immunfluoreszenz). \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle; # $p < 0.05$  vs. STZ-Placebo

An Thrombozyten gebundenes Fibrinogen, sowie auf der Thrombozyten-Oberfläche exprimiertes P-Selektin waren beide bei der mit Placebo behandelten Gruppe signifikant erhöht und konnten mit einer Rosuvastatin-Langzeittherapie gesenkt werden. Im Rahmen ihrer Aktivierung verändern Thrombozyten nicht nur ihre Oberfläche, es werden auch kleinere Fragmente ihrer Membranen als so genannte Mikropartikel (platelet-derived microparticles, PMP) freigesetzt. Die Menge der von Thrombozyten-stammenden

zirkulierenden PMP im Vollblut, gemessen an der CD42<sup>+</sup>-Fraktion zirkulierender Mikropartikel, konnte ebenfalls durch eine Rosuvastatin Therapie signifikant gesenkt werden (Abb.23).



**Abb.23:** Darstellung von PMP im Gesamtblut. Als ein Marker der Thrombozyten-Aktivierung sind die Werte der PMP nach Rosuvastatin Therapie signifikant niedriger als in unbehandelten diabetischen Tieren. # $p < 0.05$  vs. STZ-Placebo

## D. Diskussion

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase bei Diabetes im Tiermodell sowohl die eingeschränkte Endothelfunktion der Gefäße verbessert als auch die Thrombozyten-Aktivierung reduziert. Diese Daten lassen vermuten, dass eine Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit den Effekt der Statine auf Thrombozyten und Gefäße vermittelt.

### D. I. Oxidativer Stress

Die endotheliale Dysfunktion stellt eine häufige Erscheinung im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen dar und ist durch ein Ungleichgewicht zwischen NO und ROS charakterisiert. Oxidativer Stress ist die Hauptursache einer reduzierten endothelialen NO-Bioverfügbarkeit bei diabetischer Stoffwechsellaage.<sup>79</sup> Verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ließ sich in Aortensegmenten diabetischer Ratten eine signifikante Erhöhung der  $O_2^-$ -Konzentrationen feststellen (Abb.7 bis 9). Gleichzeitig war die Reaktivität der glatten Gefäßmuskelzellen auf exogen zugeführtes NO signifikant abgeschwächt, woraus man eine Verminderung der Effekte des restlichen endothelial gebildeten NO ableiten kann. Diese beiden Merkmale konnten erfolgreich durch eine Langzeittherapie mit Rosuvastatin aufgehoben werden. Während wie bereits gezeigt eine kurzzeitige Behandlung mit Statinen den oxidativen Stress im STZ-induzierten Diabetes-Modell reduzieren konnte<sup>80</sup>, liefert diese Studie den Beweis für eine chronische Reduktion des oxidativen Stresses bei experimentell erzeugtem Diabetes.

Diverse Studien haben bereits zuvor die bedeutende Rolle der eNOS-induzierten Superoxid-Freisetzung in diabetischen Modellen beschrieben.<sup>81-83</sup> Die aus dieser Arbeit gewonnenen Daten bezüglich der durch SMC erzeugten Superoxide lassen jedoch vermuten, dass das Endothel nicht die Hauptbildungsstätte der ROS ist, auch wenn dies nicht ausdrücklich ausgeschlossen werden konnte. Jedoch deutet das homogene transmurale Signal der HE-gefärbten Fluoreszenzbilder ohne erkennbare luminal betonte Signalverstärkung (Abb. 9) eher auf eine Endothel-unabhängige gesteigerte Superoxidanreicherung hin. Ergänzend hierzu spricht die Zunahme der Vasokonstriktion nach Zugabe von L-NNA in vorkontrahierten Aortenringen (Abb. 12) gegen eine signifikante Entkopplung der eNOS in diesen Versuchen. Umfassend führt dies zu der Annahme, dass NO zwar auch im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion weiterhin über die eNOS freigesetzt wird, es jedoch zu einer Inaktivierung oder Verstoffwechslung kommt, bevor es an glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) wirken und diese relaxieren kann.

## D. II. Vasokonstriktion und Vasodilatation

NO ist der potenteste Vasodilatator im menschlichen Körper. Agonisten wie Acetylcholin oder die durch den Blutstrom erzeugten Scherkräfte aktivieren von luminal die konstitutive NO-Synthase in den Endothelzellen. Das daraufhin freigesetzte NO diffundiert auf der abluminalen Seite des Endothels in die glatten Gefäßmuskelzellen und aktiviert dort die lösliche Guanylatzyklase (sGC). Die Aktivierung des Enzyms katalysiert die Konversion von GTP zum intrazellulären Botenstoff cGMP (zyklisches 3,5-Guanosinmonophosphat) und führt über eine Erniedrigung des intrazellulären Kalziums, bzw. eine cGMP-abhängige Dephosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase<sup>84</sup> in SMC zu einer Vasodilatation.<sup>85</sup> Die Bildung von NO kann pharmakologisch durch eine falsche, dem L-Arginin ähnliche Aminosäure, wie beispielsweise dem L-NG-Monomethylarginin (L-NMMA) oder dem L-Nitroargininmethylester (L-NAME) gehemmt werden, welche an der katalytischen Stelle der NO-Synthase zu einer kompetitiven Hemmung der eNOS führen. In isolierten Arterien bewirken die Inhibitoren der NO-Synthase eine endothelabhängige Kontraktion. In Studien mit eNOS-Inhibitoren wurde bewiesen, dass unter physiologischen Bedingungen eine basale Freisetzung von NO aus dem Gefäßendothel eine kontinuierliche Vasodilatation ermöglicht, bzw. dass ein Mangel an NO ein Überwiegen der Vasokonstriktoren (wie Endothelin und Angiotensin II) zur Folge hat.<sup>86</sup> Durch die überschießende Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen durch Vasokonstriktoren kommt es zu einer Gefäßverengung.<sup>86</sup> Unter den Bedingungen einer Endotheldysfunktion findet keine ausreichende durch NO induzierte Aktivierung der sGC in den umliegenden SMC statt, welche die Umwandlung von cGMP katalysieren würde. Daher unterbleibt auch die lokale Relaxation der SMC, der betroffene Gefäßabschnitt verharrt in kontrahiertem Zustand und es kommt somit zu einer chronischen Blutdrucksteigerung.<sup>87</sup>

Auch in dieser Arbeit konnten umfassende Effekte einer endothelialen Dysfunktion im Rahmen chronisch erhöhter Blutglukosewerte auf die Vasomotorik mit und ohne Rosuvastatin-Therapie beobachtet werden. So konnte zum einen die zuvor eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit der Aortensegmente durch Rosuvastatin signifikant verbessert werden (Abb. 10, 11, 12), zum anderen auch eine Verbesserung der Relaxation bereits unter geringeren Konzentrationen von Agonisten verzeichnet werden (Abb. 13 bis 16). Allerdings fiel der Grad der in diesen Versuchen beobachteten Kontraktion von diabetischen Gefäßabschnitten schwächer aus als im Rahmen der Endotheldysfunktion zu erwarten war. Daher ist anzunehmen, dass die Endotheldysfunktion nicht die einzige Ursache der beobachteten Effekte ist.

### **D. III. Endotheldysfunktion und reduzierte Reaktivität glatter Gefäßmuskelzellen**

Als die innerste Begrenzung der Gefäßwand fungiert das einschichtige Endothel als eine Signal-übertragende dynamische Schnittstelle zwischen den im Blut zirkulierenden Stoffen und den interstitiell gelegenen SMC der Gefäßwand. Eine Störung der Integrität der Endothelzell-Schicht bringt eine Veränderung ihrer Permeabilitäts-Eigenschaften mit sich, was sich letztendlich in vielfältiger Weise auf benachbarte SMC auswirkt.<sup>88</sup>

Es können zwei unterschiedliche Phänotypen von SMC unterschieden werden, welche sich durch die Verteilung ihrer Myosinfilamente und der Anordnung von sekretorischen Zellapparaten (endoplasmatisches Retikulum u. Golgi) auszeichnen. Zellen vom kontraktilem Phänotyp reagieren auf vasoaktive Substanzen (wie z.B. Endothelin, Katecholamine, Angiotensin II, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Prostaglandin I<sub>2</sub>, Leukotriene u. NO), welche entweder eine Vasokonstriktion oder eine Vasodilatation bewirken. Im Gegensatz dazu sind SMC des nicht-kontraktilem Phänotyps empfänglich für eine Reihe an Zytokinen und wachstumsregulierenden Faktoren (z.B. Platelet-derived-Growth-Factor, PDGF). Glatte Gefäßmuskelzellen dieses zweiten Typs können auf Wachstumsfaktoren reagieren, indem sie passende Rezeptoren exprimieren und Extrazellulärmatrix synthetisieren.<sup>89</sup> Im Falle einer Endothelverletzung mutieren SMC vom kontraktilem zum synthetisierenden Phänotyp, was im Bereich der Endothelläsion einen erheblichen Unterschied auf die Antwort gegenüber Agonisten ausmacht:

SMC vom synthetisierenden Typ reagieren autokrin auf PDGF und andere Wachstumsstimulatoren durch Fibroproliferation. Darüber hinaus können sie selbst bestimmte Wachstumsstimulatoren freisetzen und so benachbarte SMC sowie das Endothel selbst innerhalb der Läsion beeinflussen. Es kommt zu einer überschießenden Proliferation von SMC und der sie umgebenden Extrazellulärmatrix, zu einer ungerichteten Kontraktion und schließlich zu einer gestörten vasomotorischen Gesamtfunktion.<sup>89</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Annahme, dass es im Rahmen der Endotheldysfunktion zu einer Verschiebung des SMC-Phänotyps zugunsten eines nicht-kontraktilem Zelltyps kommt, da sich eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve auf exogenes NO beobachten ließen, was für eine reduzierte Sensitivität der SMC auf NO spricht (Abb. 15 und 16). Die Endothel-unabhängige Relaxation der Aortenringe von Rosuvastatin-behandelten Ratten war signifikant nach links zurück versetzt und nahezu deckungsgleich mit der Kurve der Kontrollen. Erklärbar ist dadurch auch das Phänomen der reduzierten Vasorelaxation durch Endothel-abhängige Agonisten (Abb. 13 und 14).

In dieser Studie konnten wir keine signifikanten Veränderungen der eNOS-Expression oder Aktivierung feststellen, weder infolge der Induktion des Diabetes noch durch eine Rosuvastatin-Langzeittherapie (weder die eNOS-Protein-Expression, noch die eNOS-Phosphorylierung an Serin wichen innerhalb der drei Versuchsgruppen voneinander ab, was sich auch in repräsentativen Western Blots bestätigte;  $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ). Da die Hochregulation der eNOS-Aktivität allerdings als ein zentraler Mechanismus der Statin-Wirkung auf Endothelzellen in anderen Studien postuliert werden konnte<sup>90;91</sup> lässt sich der Schluss ziehen, dass Ergebnisse von in vitro Versuchen nicht vorbehaltlos auf die störanfälligen in vivo Bedingungen eines gesamten Organismus übertragen werden können.

Eine weitere neue Studie berichtet von erhaltener eNOS-Expression während intestinaler Ischämie.<sup>92</sup> Es ist jedoch zu bedenken, dass diese Veränderungen nur unter den pathophysiologischen Bedingungen einer reduzierten eNOS-Expression beobachtet werden konnten. Die absolute eNOS-Expression konnte in diesen Versuchen durch eine Rosuvastatin-Therapie jedoch nicht über das Niveau der unbehandelten Kontrollen angehoben werden.<sup>92</sup> Ein weiterer wichtiger Regulator der eNOS-Funktion ist die Phosphorylierung durch die Proteinkinase Akt<sup>93</sup>, welche in einer Studie mit Obese-Zucker-Ratten durch Fluvastatin positiv beeinflusst wurde.<sup>94</sup> Jedoch waren sowohl eNOS-Phosphorylierung als auch eNOS-Expression in diesem Krankheitsmodell ebenfalls signifikant vermindert. Dass in der vorliegenden Arbeit primär weder eine reduzierte eNOS-Expression noch -Phosphorylierung bei diabetischen Ratten beobachtet wurde, könnte erklären, weshalb es im Rahmen der Rosuvastatin-Therapie nicht zu einer gesteigerten eNOS-Expression kam.

Intensiver Forschungsbedarf besteht des weiteren auch auf dem Gebiet der Substanzgruppen der Statine, da beispielsweise einem aktiven Metaboliten des Atorvastatins direkte antioxidative Effekte nachgesagt werden, während andere Statine, wie auch Rosuvastatin, diese Eigenschaft nicht besitzen<sup>95</sup>, die zugrunde liegenden Mechanismen jedoch noch weitgehend unverstanden sind.

#### **D. IV. Thrombozytenaktivierung**

Die Entwicklung einer Endotheldysfunktion ist ein sehr früher pathologischer Prozess der Atherosklerose. Patienten mit Diabetes sind einem erhöhten Risiko für thrombotische Ereignisse und einer beschleunigten Atherogenese ausgesetzt. Die Atherosklerose geht häufig der klinischen Manifestation eines Diabetes voraus und ist bei Patienten mit undiagnostiziertem und somit untherapiertem Diabetes besonders stark ausgeprägt<sup>96;97</sup>. Die Progression der atherosklerotischen Wandveränderungen bei Diabetes ist mit einer gesteigerten Thrombozyten-Degranulation assoziiert<sup>98</sup>. Ansteigende Werte der Glukose-Konzentrationen sind als unabhängige Vorboten eines steigenden Risikos für Thrombozytengerinnsel bei Patienten mit koronaren Erkrankungen identifiziert worden.<sup>99</sup> Des Weiteren sind Marker für eine Thrombozyten-Aktivierung bereits bei Patienten mit positivem Nachweis von Antikörpern gegen Pankreas-Inselzellen signifikant erhöht, noch bevor es zur Ausprägung eines manifesten Diabetes kommt.<sup>100</sup> Die Thrombozyten-Aktivierung tritt also in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung eines Diabetes in Erscheinung und nimmt eine herausragende Rolle in Bezug auf den weiteren Krankheitsverlauf ein. Dies spiegelt sich klinisch dadurch wieder, dass Patienten mit Diabetes Typ 2 ohne vorangegangenes kardiovaskuläres Ereignis dasselbe Risiko für einen Myokardinfarkt haben, wie Nichtdiabetiker mit vorangegangenem Myokardinfarkt.<sup>20</sup> Folglich haben aktivierte Thrombozyten einen bedeutenden Einfluss auf die Morbidität und Mortalität und die meisten diabetischen Patienten versterben an einem kardiovaskulären thrombotischen Ereignis.<sup>101</sup>

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Thrombozyten-Aktivierung einen der ersten pathologischen Schritte während der Entwicklung der Atherosklerose darstellt<sup>102;103</sup> und dass die Inhibition der Thrombozyten-Aktivierung und –Adhäsion sowohl einer Leukozyten-Adhäsion an der Gefäßwand, als auch einer Plaque-Formierung vorbeugen.<sup>102</sup> Des Weiteren wurde im diabetischen Maus-Modell demonstriert, dass eine Verhinderung der endothelialen Dysfunktion die Aktivierung zirkulierender Thrombozyten hemmt und dass die direkte Stimulation des NO-Zielenzym, der Guanylatzyklase, Thrombozyten-Aktivierung in diabetischen Ratten sogar wieder rückgängig machen kann.<sup>104</sup>

Thrombozyten diabetischer Patienten sind durch eine Vielzahl von Abnormalitäten, wie einem erhöhten Gesamtvolumen der Thrombozyten, einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche und der erhöhten Freisetzung von Vasokonstriktoren charakterisiert. Diese pathologischen Veränderungen werden vor allem auf zwei Merkmale eines diabetischen Stoffwechsellmilieus zurückgeführt: die Inflammation der Gefäßwand<sup>105;106</sup> und die in deren Folge entstehende endotheliale Dysfunktion. Das im

physiologischen Falle von intaktem Endothel freigesetzte NO diffundiert nicht nur nach abluminal in die interstitiell gelegenen SMC, sondern auch in das Gefäßlumen, wo es in die Thrombozyten gelangt, die aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften sehr nahe zum Endothel im Blutstrom fließen. Dort trägt es ähnlich zu den Vorgängen in SMC über den gleichen Mechanismus der sGC-Aktivierung und einer Zunahme des intrazellulären cGMP zu einer Inhibition der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation bei. Thrombozyten sezernieren ihrerseits Substanzen wie Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Serotonin, welche die Freisetzung von NO und Prostazyklin aus intakten Gefäßendothelzellen erhöhen.<sup>84;107</sup> Außerdem stimuliert auch Thrombin, das wichtigste Enzym der Gerinnungskaskade, die Bildung und Freisetzung von NO aus dem Gefäßendothel.<sup>103</sup> Diese Mechanismen gewährleisten unter physiologischen Bedingungen, dass an Stellen, an denen es zu einer Aktivierung der Thrombozyten und der Gerinnungskaskade kommt, von intakten Endothelzellen gegenregulatorisch NO freigesetzt wird, welches zu einer Vasodilatation und Hemmung der Thrombozytenaggregation führt und somit der Thrombusbildung und Vasokonstriktion entgegenwirkt.<sup>107</sup> In Gefäßabschnitten, in denen das Gefäßendothel defekt oder nicht mehr vorhanden ist, können sich Thrombozyten an die Gefäßwand anlagern und nicht nur – über die Freisetzung von Thromboxan und Serotonin – eine Vasokonstriktion provozieren, sondern auch – über die Freisetzung des Wachstumsfaktors PDGF – die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen fördern.<sup>89</sup> Die endotheliale Dysfunktion führt also zu einer verminderten endogenen Thrombozyten-Inhibition und einer gesteigerten Sensitivität der Thrombozyten gegenüber deren Agonisten, sowie zu einer Anreicherung von oxidativem Stress und den „advanced glycation end products“, welche entweder direkt den Stoffwechsel der Thrombozyten stimulieren, oder diese indirekt beeinflussen, indem sie strukturelle Veränderungen in der Gefäßwand verursachen. Im Umkehrschluss konnten Schäfer et al. erst kürzlich nachweisen, dass die Verhinderung der endothelialen Dysfunktion in vivo einer Verstärkung der Thrombozyten-Aktivierung durch eine verbesserte NO Bioverfügbarkeit vorbeugt.<sup>108</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass zusätzlich zur Normalisierung der Gefäßfunktion eine Rosuvastatin-Langzeitbehandlung die Thrombozyten-Aktivierung in vivo reduziert, was über das Thrombozyten-gebundene Fibrinogen an aktiviertes Glykoprotein IIb/IIIa und die Expression von P-Selektin an der Oberfläche zirkulierender Thrombozyten bei diabetischen Ratten bestimmt wurde. Eine Vielzahl von weiteren positiven Auswirkungen einer Statin-Therapie wurden an Patienten mit Diabetes und an Modellen der experimentellen Hypercholesterinämie beschrieben, wie beispielsweise die aufgehobene Hypercholesterin-

assoziierte Thrombozyten-Aktivierung, die Abschwächung der Thrombozyten-Reaktivität, der Thromboxan-Biosynthese, der Thrombin-Biosynthese, der Aggregation und des thrombotischen Potentials.<sup>109;110;111</sup> Neben den positiven Effekten ab Beginn der Statin-Therapie wurde jedoch auch eine Thrombozyten-Überreaktivität nach Absetzen der Therapie beobachtet.<sup>112</sup>

#### **D. V. Primärprävention durch Statine bei Patienten mit Diabetes mellitus**

Kürzlich zeigte die **CARD-Studie** (Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes), dass eine Statin-Behandlung von Patienten mit Normwerten für Cholesterin und Diabetes Typ 2 ohne vorangegangenes kardiovaskuläres Ereignis zu einer substantiellen Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse (wie Myokardinfarkt und Schlaganfall) beiträgt.<sup>113</sup> Diese Ergebnisse betonen die potentielle Rolle von Statinen und ihrer pleiotropen Effekte für die Primärprävention kardiovaskulärer Ereignisse bei Diabetes und werden daher als Behandlungsoption bei Diabetes-Patienten mit normalen Lipid-Werten diskutiert.<sup>113</sup> Ein signifikanter Schutz von Herz und Gefäßsystem wurde schon wenige Monate nach Therapiebeginn beobachtet<sup>113</sup> und Cholesterin-unabhängige positive Effekte konnten bereits in der klinischen Schlaganfall-Prävention verzeichnet werden.<sup>114</sup>

Die derzeitige Verschreibungsrate von Statinen zur Therapie des Diabetes mellitus ist relativ gering, selbst bei Patienten mit gleichzeitig bestehender kardiovaskulärer Erkrankung. Einer der Gründe dafür dürfte wohl die Inhomogenität der letzten Empfehlungen aus anerkannten Leitlinien (American Diabetes Association, Joint European Societies, National Cholesterol Education Programme, NCEP) darstellen<sup>115;116</sup>. Die European Society of Cardiology (ESC) und die European Association for the Study of Diabetes (EASD) postulieren in ihren neusten Leitlinien klar einen früheren Einsatz von Statinen vor allem in der Sekundärprävention. Sie empfehlen eine strikte Senkung des LDL-C-Spiegels bei Hochrisiko-Patienten mit Diabetes und symptomatischer CVD unter 70mg/dL (<1.9mmol/l), unabhängig vom Ausgangs-LDL-Wert.<sup>76</sup> Im Rahmen der Primärprävention wird die Indikation zum Beginn einer Statin-Therapie bei Erwachsenen mit Diabetes Typ 2 ohne CVD gestellt, sobald der Gesamtcholesterin-Wert von 130mg/dL (>3.5mmol/l) überschritten wird. In diesem Fall wird eine LDL-Reduktion um 30 bis 40% empfohlen.<sup>76</sup> Bezüglich ihres hohen Risikopotenzials wird allen Typ 1-Diabetikern über 40 Jahren eine Statin-Therapie nahe gelegt. Im Alter zwischen 18 und 39 Jahren empfehlen die Leitlinien sowohl für Typ 1 als auch für Typ 2

Diabetiker eine Statin-Therapie, sobald weitere Risikofaktoren wie beispielsweise eine Nephropathie, Hypertonie, Zeichen eines metabolischen Syndroms u.a. hinzukommen.<sup>76</sup> Kontrovers dazu sind die Ergebnisse der CARDS-Studie, welche 2/3 ihres Patientenguts aus Bereichen unterhalb dieser empfohlenen Richtlinien im Rahmen einer Primärprävention rekrutierte und dennoch einen Rückgang der allgemeinen Mortalität um 27% in der mit Statin (Atorvastatin 10 mg einmal täglich über 4 Jahre) behandelten Gruppe verzeichnen konnte. Das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe um 37% verringert werden, das eines Schlaganfalles sogar um 48%.<sup>113</sup> In einer Meta-Analyse bezüglich diverser Statin-Studien konnte eine Reduktion des Schlaganfall-Risikos um jeweils 27% pro 1 mmol/l LDL-C-Senkung festgestellt werden.<sup>117</sup> Darüber hinaus sind 70% der Diabetiker (ohne vorangegangenes kardiovaskuläres Ereignis und unter der LDL-C-Grenze von 3.35mmol/l) mit mindestens einem weiteren kardiovaskulären Risikofaktor (arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum) belastet oder bereits von einer diabetischen Langzeitkomplikation (Retinopathie, Albuminurie) betroffen und fallen somit aus der Gruppe der Diabetiker mit niedrigem kardiovaskulärem Risiko heraus. Diese Ergebnisse deuten auf die herausragende Bedeutung einer lipidsenkenden Therapie im Rahmen der Primärprävention beim Typ 2-Diabetes auch unterhalb der derzeit empfohlenen LDL-C-Grenze hin. Nicht zuletzt könnte sie denselben Stellenwert wie eine akkurate Blutdruck- und Blutglukoseeinstellung einnehmen. In jedem Fall zeigt die CARDS Studie jedoch auf, dass sowohl eine Ausweitung der Indikation für den Beginn einer Statin-Therapie bei Patienten mit Diabetes, als auch eine Senkung des durch eine Therapie zu erreichenden LDL-C-Zielniveaus sinnvoll sein könnte, zumal während der gesamten Studie keinerlei schwerwiegende durch die Behandlung hervorgerufenen Nebenwirkungen beobachtet wurden.<sup>113</sup> In wieweit diese Thesen auf den klinischen Alltag übertragbar sind, muss allerdings noch erörtert werden.

In der vorliegenden Studie konnten wir demonstrieren, dass eine Langzeittherapie mit Rosuvastatin die vaskuläre Funktion und die Thrombozyten-Aktivierung bei experimentell erzeugtem Diabetes auch ohne zugrunde liegende Hyperlipidämie günstig beeinflusst. Die pleiotropen Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren beinhalten im Allgemeinen eine Verbesserung der endothelialen Funktion, der Thrombozyten-Funktion, die Stabilisierung atherosklerotischer Plaques und die Suppression der vaskulären Inflammation.<sup>110;118</sup> Statine üben eine Vielzahl protektiver Effekte auf das Endothel aus, unter anderem eine Verminderung der NADH-Oxidase-Aktivität<sup>119</sup> und ein Anstieg der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit.<sup>120</sup> Sie verhindern die Angiotensin II-induzierte ROS-Produktion in der Aorta von Ratten<sup>121</sup> und verstärken die Funktion des Endothels von gesunden Tieren, was die

Cholesterol-unabhängigen Effekte auf die NO-Bioverfügbarkeit erklärt.<sup>119</sup> Erhöhte Lipidwerte als ein Zeichen des metabolischen Syndroms werden für gewöhnlich häufig bei Patienten mit Diabetes Typ 2 beobachtet.<sup>122;123</sup> Unter diesen Bedingungen ist eine Therapie mit Statinen angezeigt.<sup>124;125</sup> Weiterführende Studien erscheinen in jedem Fall sinnvoll, da die Etablierung effizienter therapeutischer Interventionsmöglichkeiten auf die Entwicklung der sowohl an medizinischer, als auch wirtschaftlicher und gesundheitspolitischer Bedeutung immer mehr zunehmenden Volkskrankheit Diabetes mellitus in jedem Fall notwendig sein wird.

## **E. Zusammenfassung**

Diabetes ist assoziiert mit einer endothelialen Dysfunktion sowie einer vermehrten Aktivierung von Thrombozyten. Beides erhöht wahrscheinlich das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses. In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde untersucht, ob der Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl (HMG)-CoA-Reduktase-Inhibitor Rosuvastatin zu einer Verbesserung der Endotheldysfunktion und einer Reduktion der Thrombozyten-Aktivierung im diabetischen Tiermodell beiträgt.

Zu diesem Zweck wurde männlichen Wistar Ratten einmalig Beta-Zell-toxisches Streptozotocin injiziert und dadurch künstlich ein Diabetes mit persistierender Hyperglykämie erzeugt. Die Behandlung mit Rosuvastatin (20 mg/kg Körpergewicht täglich) beziehungsweise Placebo wurde zwei Wochen nach Induktion der Hyperglykämie begonnen und über zwei weitere Wochen fortgeführt. Die Gefäßfunktion wurde anschließend an isolierten Aortensegmenten im Organbad gemessen, die Bestimmung der Thrombozyten-Aktivierung erfolgte in frischem Vollblut.

Die endothelabhängige Relaxation der Gefäße, induziert durch den rezeptorabhängigen Agonisten Acetylcholin, war in diabetischen Ratten signifikant vermindert und konnte durch die Rosuvastatin-Therapie verbessert werden. Dies ließ sich hauptsächlich auf eine deutlich reduzierte Sensitivität der Gefäßmuskulatur für Stickstoffmonoxid (NO) zurück führen, welche bei den diabetischen Tieren durch eine gesteigerte Superoxidbildung bedingt war. Rosuvastatin reduzierte signifikant die Bildung der Sauerstoffradikalen und verbesserte darüber hinaus die NO-Sensitivität. Weiterhin konnte durch die HMG-CoA-Reduktase-Inhibition die Bindung von Fibrinogen an aktiviertes GPIIb/IIIa, sowie die P-Selektin-Expression auf der Thrombozytenoberfläche als Marker der Thrombozyten-Degranulation reduziert werden, während diese beiden Marker der Thrombozyten-Aktivierung in der Placebo-behandelten diabetischen Versuchsgruppe erhöht waren.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass eine Behandlung mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Rosuvastatin bei diabetischen Ratten die Endotheldysfunktion der Gefäße verbessert und die Aktivierung von Thrombozyten durch eine verbesserte Verfügbarkeit des endogenen Thrombozyten-Inhibitors NO vermindert. Übertragen auf das menschliche Gefäßsystem könnte dieser Effekt zu einer Verminderung kardiovaskulärer Ereignisse durch eine Statin-Therapie bei Patienten mit Diabetes beitragen.

## **F. Literatur**

1. Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. *Nutrition* 1997; 13: 65.
2. Ceriello A and Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004; 24: 816-23.
3. Beckman JA, Creager MA, and Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002; 287: 2570-81.
4. Vinik A and Flemmer M. Diabetes and macrovascular disease. *J.Diabetes Complications* 2002; 16: 235-45.
5. Hauner H. [Epidemiology and costs of diabetes mellitus in Germany]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 2005; 130 Suppl 2: S64-S65.
6. Amos AF, McCarty DJ, and Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet.Med.* 1997; 14 Suppl 5: S1-85.
7. Elezi S, Kastrati A, Pache J et al. Diabetes mellitus and the clinical and angiographic outcome after coronary stent placement. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1998; 32: 1866-73.
8. Carrozza JP, Jr., Kuntz RE, Fishman RF, and Baim DS. Restenosis after arterial injury caused by coronary stenting in patients with diabetes mellitus. *Ann.Intern.Med.* 1993; 118: 344-9.

9. Levine GN, Jacobs AK, Keeler GP et al. Impact of diabetes mellitus on percutaneous revascularization (CAVEAT-I). CAVEAT-I Investigators. Coronary Angioplasty Versus Excisional Atherectomy Trial. *Am.J.Cardiol.* 1997; 79: 748-55.
10. Kjaergaard SC, Hansen HH, Fog L, Bulow I, and Christensen PD. In-hospital outcome for diabetic patients with acute myocardial infarction in the thrombolytic era. *Scand.Cardiovasc.J.* 1999; 33: 166-70.
11. Himmelmann A, Hansson L, Svensson A, Harmsen P, Holmgren C, and Svanborg A. Predictors of stroke in the elderly. *Acta Med.Scand.* 1988; 224: 439-43.
12. Tuomilehto J, Rastenyte D, Jousilahti P, Sarti C, and Vartiainen E. Diabetes mellitus as a risk factor for death from stroke. Prospective study of the middle-aged Finnish population. *Stroke* 1996; 27: 210-5.
13. Newman AB, Siscovick DS, Manolio TA et al. Ankle-arm index as a marker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Health Study (CHS) Collaborative Research Group. *Circulation* 1993; 88: 837-45.
14. El Sakka K, Fassiadis N, Gambhir RP et al. An integrated care pathway to save the critically ischaemic diabetic foot. *Int.J.Clin.Pract.* 2006; 60: 667-9.
15. Humphrey LL, Palumbo PJ, Butters MA et al. The contribution of non-insulin-dependent diabetes to lower-extremity amputation in the community. *Arch.Intern.Med.* 1994; 154: 885-92.
16. Apelqvist J and Larsson J. What is the most effective way to reduce incidence of amputation in the diabetic foot? *Diabetes Metab Res.Rev.* 2000; 16 Suppl 1: S75-S83.

17. Apelqvist J, Bergqvist D, Eneroth M, and Larsson J. [The diabetic foot. Optimal prevention and treatment can halve the risk of amputation]. *Lakartidningen* 1999; 96: 37-41.
18. Hu FB, Stampfer MJ, Solomon CG et al. The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up. *Arch.Intern.Med.* 2001; 161: 1717-23.
19. Stern MP. Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis. *Diabetes* 1995; 44: 369-74.
20. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, and Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N.Engl.J.Med.* 1998; 339: 229-34.
21. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J.Clin.Invest* 2000; 106: 453-8.
22. Reaven GM, Lithell H, and Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N.Engl.J.Med.* 1996; 334: 374-81.
23. Abel ED. Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. *Curr.Drug Targets.Immune.Endocr.Metabol.Disord.* 2005; 5: 219-26.
24. Giles TD and Sander GE. Myocardial disease in hypertensive-diabetic patients. *Am.J.Med.* 1989; 87: 23S-8S.

25. Kaysen GA and Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2004; 15: 538-48.
26. Belardinelli R. Endothelial dysfunction in chronic heart failure: clinical implications and therapeutic options. *Int.J.Cardiol.* 2001; 81: 1-8.
27. Davis CJ, Gurbel PA, Gattis WA et al. Hemostatic abnormalities in patients with congestive heart failure: diagnostic significance and clinical challenge. *Int.J.Cardiol.* 2000; 75: 15-21.
28. Giles TD. The patient with diabetes mellitus and heart failure: at-risk issues. *Am.J.Med.* 2003; 115 Suppl 8A: 107S-10S.
29. Coats AJ and Anker SD. Insulin resistance in chronic heart failure. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2000; 35: S9-14.
30. Doehner W, Anker SD, and Coats AJ. Defects in insulin action in chronic heart failure. *Diabetes Obes.Metab* 2000; 2: 203-12.
31. Shehadeh A and Regan TJ. Cardiac consequences of diabetes mellitus. *Clin.Cardiol.* 1995; 18: 301-5.
32. Schafer A, Alp NJ, Cai S et al. Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004; 24: 1720-6.
33. Schafer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, and Channon KM. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation* 2004; 109: 1819-22.

34. Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikstrom-Jonsson E, Goodall AH, and Hjerdahl P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000; 20: 2702-8.
35. May AE, Kalsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, and Gawaz M. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 2002; 106: 2111-7.
36. Alheid U, Frolich JC, and Forstermann U. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb.Res.* 1987; 47: 561-71.
37. Tooke JE. Microvascular function in human diabetes. A physiological perspective. *Diabetes* 1995; 44: 721-6.
38. Feener EP and King GL. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: role in cardiovascular disease. *Heart Fail.Monit.* 2001; 1: 74-82.
39. Kaysen GA and Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2004; 15: 538-48.
40. Arosio E, Minuz P, and Prior M. [Endothelial function and the microcirculation in diabetes mellitus]. *Ann.Ital.Med.Int.* 1999; 14: 106-13.
41. Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J.Pathol.* 2003; 200: 537-46.

42. Joy SV, Scates AC, Bearely S et al. Ruboxistaurin, a protein kinase C beta inhibitor, as an emerging treatment for diabetes microvascular complications. *Ann.Pharmacother.* 2005; 39: 1693-9.
43. [Packard C.](#) and [Olsson AG.](#) Management of hypercholesterolaemia in the patient with diabetes. 2002: 13:27-32
44. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.
45. Baynes JW and Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
46. Chang KC, Chung SY, Chong WS et al. Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1993; 266: 992-1000.
47. Young IS, Tate S, Lightbody JH, McMaster D, and Trimble ER. The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic.Biol.Med.* 1995; 18: 833-40.
48. Halliwell B and Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-85.
49. Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, and Baquer NZ. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem.Pharmacol.* 1993; 45: 539-42.
50. McLennan SV, Hefferman S, Wright L et al. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 344-8.

51. Maritim AC, Sanders RA, and Watkins JB, III. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J.Biochem.Mol.Toxicol.* 2003; 17: 24-38.
52. Kaysen GA and Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2004; 15: 538-48.
53. Mehta JL, Rasouli N, Sinha AK, and Molavi B. Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2006; 38: 794-803.
54. Forstermann U. Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 2006; 62 Suppl 13: 5-12.
55. Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M et al. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; 96: 8120-5.
56. Schafer A, Burkhardt M, Vollkommer T et al. Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochem.Pharmacol.* 2003; 65: 397-405.
57. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, and Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96: 25-8
58. [Berne C](#) and [Siewert-Delle A](#). Comparison of rosuvastatin and atorvastatin for lipid lowering in patients with type 2 diabetes mellitus: results from the URANUS study. 2005; 4: 7-3.

59. [Tuomilehto J](#). Reducing coronary heart disease associated with type 2 diabetes: lifestyle intervention and treatment of dyslipidaemia. 2003; 21: 27-4.
60. Liao JK and Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2005; 45: 89-118.
61. Istvan ES and Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001; 292: 1160-4.
62. Goldstein JL and Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-30.
63. Paoletti R, Fahmy M, Mahla G, Mizan J, and Southworth H. Rosuvastatin demonstrates greater reduction of low-density lipoprotein cholesterol compared with pravastatin and simvastatin in hypercholesterolaemic patients: a randomized, double-blind study. *J.Cardiovasc.Risk* 2001; 8: 383-90.
64. Davidson M, Ma P, Stein EA et al. Comparison of effects on low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol with rosuvastatin versus atorvastatin in patients with type IIa or IIb hypercholesterolemia. *Am.J.Cardiol.* 2002; 89: 268-75.
65. Olsson AG, Istad H, Luurila O et al. Effects of rosuvastatin and atorvastatin compared over 52 weeks of treatment in patients with hypercholesterolemia. *Am.Heart J.* 2002; 144: 1044-51.
66. Laufs U, La F, V, Plutzky J, and Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129-35.

67. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat.Med.* 2000; 6: 1004-10.
68. Jones SP, Gibson MF, Rimmer DM, III, Gibson TM, Sharp BR, and Lefer DJ. Direct vascular and cardioprotective effects of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2002; 40: 1172-8.
69. McTaggart F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. *Atheroscler.Suppl* 2003; 4: 9-14.
70. Bolego C, Poli A, Cignarella A, Catapano AL, and Paoletti R. Novel statins: pharmacological and clinical results. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 2002; 16: 251-7.
71. Istvan E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atheroscler.Suppl* 2003; 4: 3-8.
72. McTaggart F, Buckett L, Davidson R et al. Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am.J.Cardiol.* 2001; 87: 28B-32B.
73. Tuomilehto J, Leiter LA, and Kallend D. A review of the efficacy of rosuvastatin in patients with type 2 diabetes. *Int.J.Clin.Pract.Suppl* 2004;30-40.
74. Chapman MJ and McTaggart F. Optimizing the pharmacology of statins: characteristics of rosuvastatin. *Atheroscler.Suppl* 2002; 2: 33-6.
75. Irons BK and Kroon LA. Lipid management with statins in type 2 diabetes mellitus. *Ann.Pharmacother.* 2005; 39: 1714-9.

76. Ryden L, Standl E, Bartnik M et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur.Heart J.* 2007; 28: 88-136.
77. Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann SK, Tas P, Ertl G, and Bauersachs J. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc.Res.* 2003; 58: 655-62.
78. Fleming I, Bauersachs J, Schäfer A, Scholz D, Aldershvile J, and Busse R. Isometric contraction induces the Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1123-8.
79. Landmesser U, Harrison D, and Drexler H. Oxidant stress-a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2006; 62: 13-9.
80. Tsubouchi H, Inoguchi T, Sonta T et al. Statin attenuates high glucose-induced and diabetes-induced oxidative stress in vitro and in vivo evaluated by electron spin resonance measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 2005; 39: 444-52.
81. Alp NJ, Mussa S, Khoo J et al. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J.Clin.Invest* 2003; 112: 725-35.
82. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 105: 1656-62.

83. Kalinowski L, Dobrucki LW, Brovkovich V, and Malinski T. Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin. *Circulation* 2002; 105: 933-8.
84. Rapoport RM, Draznin MB, and Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983; 306: 174-6.
85. Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C et al. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br.J.Pharmacol.* 2002; 136: 773-83.
86. Rees DD, Palmer RM, and Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989; 86: 3375-8.
87. Jain S, Ventura H, and deBoisblanc B. Pathophysiology of pulmonary arterial hypertension. *Semin.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* 2007; 11: 104-9.
88. White CR and Frangos JA. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 2007.
89. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
90. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J.Clin.Invest* 1998; 101: 2711-9.

91. Laufs U, La F, V, Plutzky J, and Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129-35.
92. Naito Y, Katada K, Takagi T et al. Rosuvastatin reduces rat intestinal ischemia-reperfusion injury associated with the preservation of endothelial nitric oxide synthase protein. *World J.Gastroenterol.* 2006; 12: 2024-30.
93. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399: 597-601.
94. Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H et al. Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2005; 288: H1770-H1776.
95. Mason RP, Walter MF, Day CA, and Jacob RF. Active metabolite of atorvastatin inhibits membrane cholesterol domain formation by an antioxidant mechanism. *J.Biol.Chem.* 2006; 281: 9337-45.
96. Wagenknecht LE, Zaccaro D, Espeland MA, Karter AJ, O'Leary DH, and Haffner SM. Diabetes and progression of carotid atherosclerosis: the insulin resistance atherosclerosis study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1035-41.
97. Hunt KJ, Williams K, Rivera D et al. Elevated carotid artery intima-media thickness levels in individuals who subsequently develop type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1845-50.
98. Fateh-Moghadam S, Li Z, Ersel S et al. Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1299-303.

99. Shechter M, Merz CN, Paul-Labrador MJ, and Kaul S. Blood glucose and platelet-dependent thrombosis in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 300-7.
100. Tschoepe D, Driesch E, Schwippert B, and Lampeter EF. Activated platelets in subjects at increased risk of IDDM. DENIS Study Group. Deutsche Nikotinamid Interventionsstudie. *Diabetologia* 1997; 40: 573-7.
101. Resnick HE, Harris MI, Brock DB, and Harris TB. American Diabetes Association diabetes diagnostic criteria, advancing age, and cardiovascular disease risk profiles: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2000; 23: 176-80.
102. Massberg S, Brand K, Gruner S et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J.Exp.Med.* 2002; 196: 887-96.
103. Huo Y, Schober A, Forlow SB et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat.Med.* 2003; 9: 61-7.
104. Schafer A, Flierl U, Kobsar A, Eigenthaler M, Ertl G, and Bauersachs J. Soluble guanylyl cyclase activation with HMR1766 attenuates platelet activation in diabetic rats. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2006; 26: 2813-8.
105. Kelly R and Steinhubl SR. Platelet dysfunction. In: Marso SP and Stern DM, eds. *Diabetes and cardiovascular disease.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2004, 251-63.
106. Tschoepe D and Menart-Houtermans B. Diabetes mellitus. In: Michelson AD, ed. *Platelets.* Academic Press, San Diego. 2002, 435-45.

107. Yang ZH, Stulz P, von Segesser L, Bauer E, Turina M, and Luscher TF. Different interactions of platelets with arterial and venous coronary bypass vessels. *Lancet* 1991; 337: 939-43.
108. Schäfer A, Alp NJ, Cai S et al. Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1720-6.
109. Koh KK. Effects of HMG-CoA reductase inhibitor on hemostasis. *International Journal of Cardiology* 2000; 76: 23-32.
110. Takemoto M and Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1712-9.
111. Thompson PD, Moyna NM, Michael White C, Weber KM, Giri S, and Waters DD. The effects of hydroxy-methyl-glutaryl co-enzyme A reductase inhibitors on platelet thrombus formation. *Atherosclerosis* 2002; 161: 301-6.
112. Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M et al. Platelet hyperreactivity after statin treatment discontinuation. *Thromb Haemost* 2003; 90: 476-82.
113. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 685-96.
114. Hess DC, Demchuk AM, Brass LM, and Yatsu FM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins): A promising approach to stroke prevention. *Neurology* 2000; 54: 790-6.
115. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of

European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts).

Eur.J.Cardiovasc.Prev.Rehabil. 2003; 10: S1-S10.

116. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004; 24: e149-e161.
117. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, and Peto R. Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet* 2004; 363: 757-67.
118. Wolfrum S, Jensen KS, and Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 729-36.
119. Vecchione C and Brandes RP. Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circ.Res.* 2002; 91: 173-9.
120. Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2004; 110: 1933-9.
121. Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, and Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension* 2002; 40: 142-7.
122. Haffner SM. Lipoprotein disorders associated with type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *Am J Cardiol* 2002; 90: 55i-61i.

123. Sattar N, Gaw A, Scherbakova O et al. Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2003; 108: 414-9.
124. Haffner SM. Statin therapy for the treatment of diabetic dyslipidemia. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19: 280-7.
125. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2006. *Diabetes Care* 2006; 29: S4-42.

## **Danksagung**

Ich danke allen, die an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Johann Bauersachs, der diese Arbeit ermöglicht hat, Andreas Schäfer für die sehr gute Betreuung über die Jahre der Erstellung hinweg und Bernhard Siedler, ohne den trotz aller guter Voraussetzungen diese Arbeit nie zum Abschluss gekommen wäre.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben:

Name: Melinda Hemberger

Geburtstag: 21.11.1980

Geburtsort: Landsberg am Lech

Adresse: Schiestlstr. 36, 97080 Würzburg

Email: melindahemberger@hotmail.com

## Schulbildung:

1987: Einschulung in die Oskar-Popp-Grundschule Kist

1991: Übertritt an das Röntgengymnasium Würzburg

1995: Wechsel an das Mozart-Gymnasium Würzburg

Juni 2001: Schulabschluss mit dem allgemeinen Abitur am Mozart-Gymnasium Würzburg

## Medizinstudium:

seit Oktober 2001: Medizinstudium an der Universität Würzburg

2002: Pflegepraktikum im Juliusspital Würzburg sowie am Missionsärztlichen Institut Würzburg

August 2003: Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung

März 2004: Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin der Universitätsklinik Würzburg

August 2005: Famulatur in der Abteilung für Allgemeine Chirurgie des Universitätskrankenhauses Bangkok (Ramathibodi Hospital)

September/Oktober 2005: Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin der Universitätsklinik in Frankfurt am Main

März 2006: Famulatur in der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universitätsklinik Würzburg

## Praktisches Jahr: August 2006 bis Juli 2007

Wahlfach: Urologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Innere Medizin: Klinikum Coburg

Chirurgie: Spital Rorschach, Schweiz

Abschluss des Medizinstudiums mit dem zweiten Staatsexamen für Humanmedizin im  
Oktober 2007

seit Januar 2008: Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Urologie und  
Kinderurologie der Universitätsklinik Würzburg

Würzburg, 04.04.2009